PLANTA

ARCHIV
FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

E. BÜNNING-TÜBINGEN, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK
R. HARDER-GÖTTINGEN, **W. SCHUMACHER**-BONN, **G. TISCHLER**-KIEL

HERAUSGEGEBEN VON

WILHELM RUHLAND UND **OTTO RENNER**

41. BAND, 6. (SCHLUSS-)HEFT

MIT 45 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 20. JULI 1953)

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1953

Planta (Berl.)

Preis DM 22.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik.

Begründet 1925. Herausgegeben von *W. Ruhland, H. Winkler*. Berlin, Springer. Bis Band 21 als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie, Abteilung E: Planta".

Die Zeitschrift **„Planta"**, Archiv für wissenschaftliche Botanik steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald als möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 60.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophote u. ä., von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe III. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Wilhelm Ruhland, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim* oder an

Professor Dr. Otto Renner, (13b) *München 38, Botanische Staatsanstalten, Menzinger Straße 67*.

Springer-Verlag

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 24 92 51
und
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 24, Fernsprecher 2440

Vertriebsvertretung im Ausland:

Lange, Maxwell & Springer Ltd., 242 Marylebone Road, London N.W. 1

41. Band. **Inhaltsverzeichnis.** 6. (Schluß-)Heft

Seite

Paech, K., Über die Lichtkeimung von *Lythrum salicaria*. (Ein Beitrag zur Physiologie der Polyphenole.) Mit 5 Textabbildungen 525

Linser, H., und F. Maschek, Kolorimetrische und biologische Bestimmung sowie chromatographische Trennung von Wuchsstoffen aus Pflanzen. Mit 1 Textabbildung 567

Wiedow, H.-L., und H. v. Guttenberg, Über die Abhängigkeit der Wirkstoffbildung von Licht und Photosynthese. Mit 3 Textabbildungen 589

Kandler, O., und A. Vieregg, Über den Einfluß von β-Indolylessigsäure auf den Stoffwechsel in vitro kultivierter Maiswurzeln und Spargelsprosse. Mit 33 Textabbildungen 613

Meyer, D. E., Über das Verhalten einzelner isolierter Prothalliumzellen und dessen Bedeutung für Korrelation und Regeneration. Mit 3 Textabbildungen 642

Autorenverzeichnis des 41. Bandes 646

Planta, Bd. 41, S. 525—566 (1953).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen.

ÜBER DIE LICHTKEIMUNG VON *LYTHRUM SALICARIA* *.

(Ein Beitrag zur Physiologie der Polyphenole.)

Von

K. PAECH.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. Dezember 1952.)

I. Einleitung.

Es wäre ein völlig aussichtsloses Unterfangen, einleitend die Literatur über Lichtkeimung auch nur einigermaßen vollständig in übersichtlicher Form kurz referieren zu wollen. Eine knappe Darstellung in dem weiteren Rahmen von Betrachtungen über die Samenruhe ist von CROCKER gegeben worden. Wesentliche Teilprobleme wurden in neuerer Zeit von WIESER, TILLY, KIPP, MEISCHKE eingehend behandelt. Die jüngsten Veröffentlichungen über Lichtkeimung der Samen von *Arabidopsis thaliana* und *Digitalis purpurea* stammen von KUGLER bzw. GROHNE.

Selbst wenn man das undurchdringliche Gestrüpp von Hypothesen und Vermutungen über den Mechanismus der Lichtwirkung bei der Keimungsauslösung zu umgehen und sich nur auf die Versuchsergebnisse zu stützen versucht, stößt man auf ganze Reihen unhaltbarer und durch jüngere Untersuchungen widerlegter Befunde. Gleichwohl sind so zahlreiche Beobachtungen gesammelt und bestätigt worden, daß für jede Vorstellung über das Wesen der Lichtkeimung reichlich Bau- und Prüfsteine zu finden sind.

Zunächst sollen einige immer wieder zu unrecht zitierte Angaben herausgestellt werden, denen keine Bedeutung für die Aufklärung der Lichtkeimungsvorgänge zukommen dürfte. Enzyme hätten die keimungsauslösende Wirkung des Lichtes ersetzen können. Bei der Anwendung von Enzymlösungen ist jedoch die Samenschale gleichzeitig angestochen worden (KINZEL), obwohl das Anstechen allein die Samen auch ohne Licht keimen läßt. Bei späteren Versuchen hat sich in den Enzymlösungen sicher sehr bald Bakterienwachstum eingestellt, was nicht bedacht wurde. Stickstoffverbindungen, speziell Nitrite, Nitrate und Salpetersäure, sollen das Licht bei manchen Lichtkeimern weitgehend ersetzen können. Wenn die Versuchsergebnisse auch nicht angezweifelt werden sollen, so kann es sich dabei aber nicht um eine zu verallgemeinernde Erscheinung handeln. Sie wurde in neuerer Zeit auch nicht

* Herrn Prof. Dr. O. RENNER zum 70. Geburtstag gewidmet.

bestätigt (Tilly). Selbst wenn die Salpetersäure und ihre Salze die lichtbedürftigen Samen bei der Keimung fördern, so hätte man mindestens ebenso an deren oxydierende Wirkung wie an ihren Stickstoffgehalt denken müssen. Andere Versuche, die als „in jeder Richtung einwandfrei" dargestellt wurden, hatten die Temperaturkonstanz vernachlässigt, die aber bei der Lichtkeimung unerläßlich ist, weil sich sonst die Effekte von Temperaturschwankungen überlagern. Außerdem wurde beim Auszählen der Dunkelportionen rotes Licht benutzt (Hesse, Busse), obwohl gerade langwelliges Licht besonders stark fördernd auf Lichtkeimer wirkt.

Auch in anderer Hinsicht scheint lange Zeit die nötige Klarheit und Unterscheidung gefehlt zu haben. Crocker hat deutlich herausgestellt, daß die Unfähigkeit der Samen zu keimen durchaus nichts Einheitliches ist. Samen mit dormanten Embryonen müssen von solchen mit „harter" Schale aber Embryonen, die entwicklungsbereit sind, unterschieden werden. Andere Samen haben — zunächst wenigstens — sowohl eine undurchdringliche Schale als auch einen ruhenden Embryo. Die Einwirkungen, welche die Keimung auslösen, müssen dementsprechend an ganz verschiedenen Stellen des Samens ansetzen. Lichtkeimer gibt es offenbar unter allen diesen Samentypen. Wenn man das berücksichtigt, wird auch der zum Teil heftig geführte Streit, ob das Licht an der Testa oder am Embryo angreife, gegenstandslos: beide Möglichkeiten sind gegeben. „Samenschalengehemmte" Samen keimen nach Anstechen oder sonstigem Aufbrechen der Testa unter optimalen Keimungsbedingungen im Dunklen ebenso leicht und vollständig wie bei mechanisch unveränderter Samenschale im Licht. Bei anderen Samentypen hingegen muß das Licht den Embryo treffen, denn auch geschälte Samen sind noch lichtempfindlich. Es ist durchaus denkbar, daß das Licht in beiden Fällen ganz verschiedene Wirkung ausübt. Man hat bisher wohl die Lichtkeimer (und ebenso die Dunkelkeimer) als eine zu einheitliche Gruppe in bezug auf das Keimverhalten angesehen.

Die beiden Teile des Samens, der Embryo und die Testa, verhalten sich vor und während der Keimung durchaus nicht immer gleichartig, sondern sie wirken oft gegeneinander. Die Kraftentfaltung des Keimlings zum Durchbrechen der Samenschale ist der sinnfälligste Ausdruck für das Gegenspiel von Testa und Embryo. Sie unterscheiden sich in grundlegenden Eigenschaften: dort zumeist abgestorbene, auf alle Fälle nicht mehr wachsende Zellen, hier hingegen im wesentlichen embryonale Gewebe. Ganz abgesehen davon sind Testa und Embryo, falls es sich nicht um reine Linien handelt, auch erblich verschieden. Der für den Beginn der Keimung günstige Zustand wird deshalb oft nicht bei beiden Partnern unter denselben Innen- und Außenbedingungen erreicht sein (vgl. zahlreiche Beispiele bei Crocker). In den einheimischen Getreide-

körnern ist der Embryo keimbereit und die Samen-(und Frucht)hülle legt der Keimung nie wesentliche Hindernisse in den Weg. Bei allerlei anderen Samen ist zwar der Embryo auch keimfähig, aber der Zustand der Testa bzw. des Endocarps erlaubt zunächst keine Keimung, weil Wasser und Sauerstoff nicht zum Embryo zutreten können. Erst nach Auflockern oder Aufbrechen der Samenschale und dann im allgemeinen sofort beginnt das Wachstum. Bei gewissen Lichtkeimern scheint es möglich zu sein, zwar die Samenschale in einen für die Keimung geeigneten Zustand zu versetzen, ohne daß der Embryo angeregt wird, der erst bei höherer Temperatur oder nach Temperaturschwankungen dann auch im Dunkeln wächst (*Ranunculus sceleratus*, GASSNER 1915b). Es erscheint uns, als ob immer dann, wenn Temperaturschwankungen zur Auslösung der Keimung führen, der Embryo der „begrenzende Faktor" ist. (Der sogleich zu erwähnende Fall von *Rhus ovata*, wo Hitze die Testa sprengt, gehört natürlich nicht hierher.)

Für *den* Samentyp, bei dem die Testa das Keimhindernis darstellt, seien noch einige Beispiele angeführt, die zeigen, daß dieser Widerstand in recht verschiedenartiger Weise gebrochen werden kann, wobei die Lichtwirkung eben auch eine Möglichkeit bietet. Das Hauptobjekt unserer Untersuchungen, *Lythrum salicaria*, gehört hierher. Unter natürlichen Bedingungen wird durch einen photochemischen Prozeß in der gequollenen Samenschale das in ihr liegende Hindernis beseitigt. Im Experiment, vielleicht unter gewissen Bedingungen auch in der Natur, genügt die mechanische Verletzung der Testa. Die Samen von *Pectis* müssen etwa 24 Std durch Wasser ausgelaugt werden, ehe sie zu keimen beginnen. In der Natur keimt diese Art deshalb nur nach starken anhaltenden Regenfällen. *Cercidium*-Samen müssen angeritzt werden. Unter natürlichen Bedingungen geschieht dies, wenn die Samen zwischen Geröll geraten, das von fließendem Wasser bewegt wird. Der Busch wächst deshalb nur am Ufer von Flüssen und am Rande von Erosionsrinnen (WENT). Bei *Rhus ovata* hemmt normalerweise die Samenschale, oder genauer gesagt eine bestimmte Zellschicht in ihr, das Auskeimen. Die Entfernung oder Durchlöcherung dieser mittleren Schicht der Samenschale führt sofort zu einer hohen Keimzahl. Die Embryonen sind jederzeit keimbereit. In der Natur wurde die Sprengung der Testa nach Abbrennen der Böden, in denen sich eine große Zahl von *Rhus ovata*-Samen befanden, beobachtet (STONE und JUHREN). Unter völlig natürlichen Verhältnissen öffnet wohl erst die mikrobielle Verrottung der Testa den Weg für den Zutritt von Wasser und (oder) Sauerstoff zum Embryo. Die Samenschale von *Gleditschia triacanthos* hat wie manche anderen Samen eine für Wasser impermeable Schicht (CAVAZZA). Einen interessanten Grenzfall einer „beinahe undurchlässigen" Samenschale beschrieb BROWN genauer. Die Testa von *Cucurbita Pepo* besteht aus

2 durch einen Luftraum getrennten Schichten, von denen die innere für Gase viel leichter durchlässig ist als die äußere. Diese äußere Hülle ist jedoch durch die dauernd offen bleibende Mikropyle durchbrochen, so daß für den Gasaustausch nur die relativ gut durchlässige innere Schicht maßgebend ist, weshalb bei diesen Samen keine besonderen keimungsvorbereitenden Veränderungen der Testa notwendig sind. Bemerkenswert ist, daß hier nicht die Durchlässigkeit für Wasser, sondern der für die Keimung meistens ebenso unerläßliche Durchtritt von Sauerstoff in Frage steht. Im übrigen diffundiert CO_2 viel leichter durch die beiden Testaschichten als Sauerstoff, was für die unten zu erörternden Verhältnisse bei *Lythrum* und anderen samenschalengehemmten Lichtkeimern im Auge behalten werden soll. „Die Wirkung der Samenschale besteht darin, daß sie den Zutritt des für die Keimung der Samen und Früchte notwendigen Sauerstoffs verhindert" (Axentjew).

Am anatomischen Aufbau der Samenschale ist oft auffallend, daß sich die Zellen der innersten Lage, also der Innenseite des inneren Integumentes, mit dunklen festen Inhaltsstoffen gefüllt haben. Diese Pigmentschicht ist manchmal an der Mikropyle und Chalaza unterbrochen, oder sie wird durch ähnlich gefüllte Zellen jedoch anderer Abstammung ersetzt und dann wieder zu einer geschlossenen Hülle ergänzt (Netolitzky). Auf eine gewisse Ähnlichkeit in Bau und chemischer Ausstattung von Samenschalen und Rinden bzw. Borken ist gelegentlich hingewiesen worden. In beiden werden neben anderen sekundären Pflanzenstoffen fast regelmäßig Polyphenole abgelagert, die nach dem Absterben der Zellen als die typischen braunen und roten Borkefärbungen und die chemisch ähnlichen Pigmente der Samenschale sichtbar werden. Das gilt jedenfalls für alle lichtempfindlichen Samen; denn selbst wenn einmal eine „helle" Rasse von Dunkelkeimern *(Nigella sativa)* gefunden wird, so besitzt auch diese in den tieferen Lagen der Testa eine Zellschicht mit braungefärbtem Inhalt (Böhmer).

Die eigenen Untersuchungen, die sich zunächst auf Samen desjenigen lichtbedürftigen Typs beschränkten, bei dem die Belichtung durch künstliche Perforation der Testa im dunklen Keimbett ersetzt werden kann, wurzeln in der Beschäftigung mit dem Stoffwechsel der Polyphenole bei höheren Pflanzen. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser charakteristischen Pflanzenstoffe, ihre Lokalisation in den Samen und die bisher bekannten Begleiterscheinungen der Keimung bestimmter lichtgeförderter Samen ließen eine Beteiligung der Polyphenole am Mechanismus der Lichtwirkung als möglich erscheinen.

Polyphenole im weitesten Sinne sind in den Embryonen voluminöser Samen verschiedentlich nachgewiesen worden. Kakaosamen enthalten bedeutende Mengen von Anthocyanen und Katechinen. In Kaffeesamen und *Helianthus*-Kernen ist vor allem Chlorogensäure identifiziert

worden. In Eicheln sind reichlich Tannine vorhanden, die im ruhenden Samen an Kolloide adsorbiert sind (vgl. weiterhin PAECH 1950). Sehr viele Samen enthalten Polyphenole jedoch in der Testa, die sich bald nach dem Absterben gelb, braun oder schwarz färbt und im Laufe der Nachreifung nicht selten nachdunkelt. Bei genauerer Untersuchung findet man diese Farbstoffe, deren Polyphenolnatur als „Gerbstoffe" nachgewiesen wurde (z. B. TILLY), meist in begrenzten Schichten, in einem „Gerbstoffhorizont" der Samenschale abgelagert.

Trotz der zahlreichen und vielseitigen Untersuchungen über das Phänomen der Lichtkeimung ist die Frage nach der Art des lichtempfindlichen Systems recht vernachlässigt worden. MEISCHKE, der nach der Herausarbeitung der wirksamen Wellenlängen am ehesten Rückschlüsse auf das wirksame Pigment hätte ziehen können, spricht nur von keimungsfördernden und keimungshemmenden Spektralbereichen, ohne sie in bezug auf das wirksame Prinzip auszuwerten. Die einzige konkrete Angabe, soweit wir sehen, stammt von FLINT und MCALLISTER, die bei „Samen" von *Lactuca* eine besondere Förderung der Keimung mit Wellenlängen in der Nähe des Absorptionsmaximums vom Chlorophyll fanden. Diese Befunde sind in ihrer Bedeutung für die Lösung des Problems der Lichtkeimung wahrscheinlich überschätzt worden. Selbst wenn die Kurve der relativen Förderung und Hemmung der Keimung durch Strahlung verschiedener Wellenlängen gewisse Ähnlichkeit mit der Absorptionskurve des Chlorophylls haben sollte, was aus den mitgeteilten Zahlen zwar für das Absorptionsmaximum bei 680 mμ aber nicht für die Absorption im Kurzwelligen hervorgeht, so handelt es sich bei dem benutzten Objekt um einen besonderen Fall, denn bei den Achänen, die hier vorliegen, enthält zwar die Fruchtwand aber nicht der Same Chlorophyll (RESÜHR 1939b). In anderen lichtempfindlichen Samen ist Chlorophyll bisher nicht nachgewiesen worden. Wenn in diesem ungewöhnlichen Falle das vom Chlorophyll absorbierte Licht sich am Ende keimungsfördernd auswirkt, so muß das noch nicht auf eine unmittelbare Wirkung hindeuten. Es liegt viel näher anzunehmen, daß das in abgestorbenen Zellen vorhandene Chlorophyll ähnlich der von MOLISCH beobachteten Erscheinung bei getrockneten, wieder angefeuchteten Blättern noch photolytisch Wasser zerlegen und damit Sauerstoff und ein Äquivalent aktivierten Wasserstoffs bilden kann, von denen der eine oder andere in das System der Lichtkeimung eingreift (s. unten).

II. Versuche.

A. Das Material.

Das am besten untersuchte Beispiel für „samenschalengehemmte" Lichtkeimer ist *Lythrum salicaria*. Als Kriterium für diesen Typ dient der Nachweis, daß nach mechanischem Verletzen der Samenschale die

Keimgeschwindigkeit im Licht wesentlich gesteigert oder die Keimzahl erhöht und in den ausgesprochenen Fällen die Keimung auch im Dunkeln ermöglicht wird. Wenn auch für *Lythrum* immer die Testa als das entscheidende Hindernis für die Keimung erkannt wurde, so können doch auch hier andere nicht auf die Testa einwirkende Faktoren die Keimzahl bestimmen. Dazu gehört vor allem die für das Embryowachstum optimale Temperatur. Alle von uns gelegentlich herangezogenen Rassen von *Nicotiana tabacum** sowie eine Rasse von *Digitalis purpurea* waren nicht rein samenschalengehemmte Typen, denn bei ihnen erhöhte zwar Verletzen der Testa die Keimgeschwindigkeit im Licht, ohne aber Dunkelkeimung auszulösen. Hier bedarf auch der Embryo der Lichtwirkung. Die doppelte Abhängigkeit der Samen gewisser *Nicotiana tabacum*-Rassen vom Licht geht auch aus Bihlmeiers Daten hervor. Ungeschälte Samen keimen im Dunkeln nur zu 0,5%, während geschälte Samen zu 50% keimen. Von dem Rest der geschälten Samen, die im Dunkeln nicht gekeimt waren, kamen später im Licht noch weitere 30% zur Keimung.

Wahrscheinlich hat *Chloris ciliata* rein schalen-(bzw. spelzen)-gehemmte Samen (Gassner 1915b). Eine Rasse von *Oenothera biennis*, die zu den obligaten Lichtkeimern gehört, verliert die Lichtempfindlichkeit, sobald die Testa angestochen worden ist. Sie gehört deshalb streng zum schalengehemmten Typ (Siegel). Auch bei Dunkelkeimern scheint es solche rein schalengehemmte Typen zu geben. *Phacelia*-Samen keimten im Dunkeln zu 83—84%, im Licht nur zu 14—18%. Abgeriebene oder angestochene Samen erreichten jedoch auch im Licht Keimzahlen von 68 und 93% (Axentjew).

Nicht immer ist der Untersuchung von Licht- und Dunkelkeimern eine genauere anatomische Analyse der betreffenden Samen vorausgeschickt oder angeschlossen worden, obwohl der Angriffspunkt des Lichtes einmal in der Samenschale und ein andermal im Sameninnern gesucht wurde. Der oben beschriebene „Gerbstoffhorizont" scheint bei Lichtkeimern den Samen stets *lückenlos* zu umgeben. Eine sehr schöne Darstellung dieser Erscheinung, allerdings ohne die besondere Bedeutung zu erwähnen, findet sich bei Grohne für *Digitalis purpurea*.

Unsere Abb. 1 gibt einen schematischen Längsschnitt durch den Samen und einen stärker vergrößerten Ausschnitt aus der Samenschale von *Lythrum salicaria* wieder, in der die relativ dickwandigen und kleinlumigen, in der Längsrichtung des Samens gestreckten Zellen der innersten Schicht mit einer körnigen braunen Masse gefüllt sind. Die üblichen histochemischen Reagentien auf „Gerbstoffe" bzw. Phloroglukotannoide geben folgende Reaktionen. Vanillin färbt die Wände der äußersten

* Herrn Direktor Dr. K. Schmid vom Tabakforschungsinstitut Forchheim (Baden) danke ich verbindlichst für dieses Samenmaterial.

großlumigen Zellschicht purpurrot und den Inhalt der innersten Zellen etwas mehr ziegelrot. Dimethylaminobenzaldehyd färbt die Wände der äußeren Zellen und den Inhalt der inneren Zellen purpurrot, und $FeCl_3$ gibt den Wänden der Außenschicht eine tintenblaue und dem Inhalt

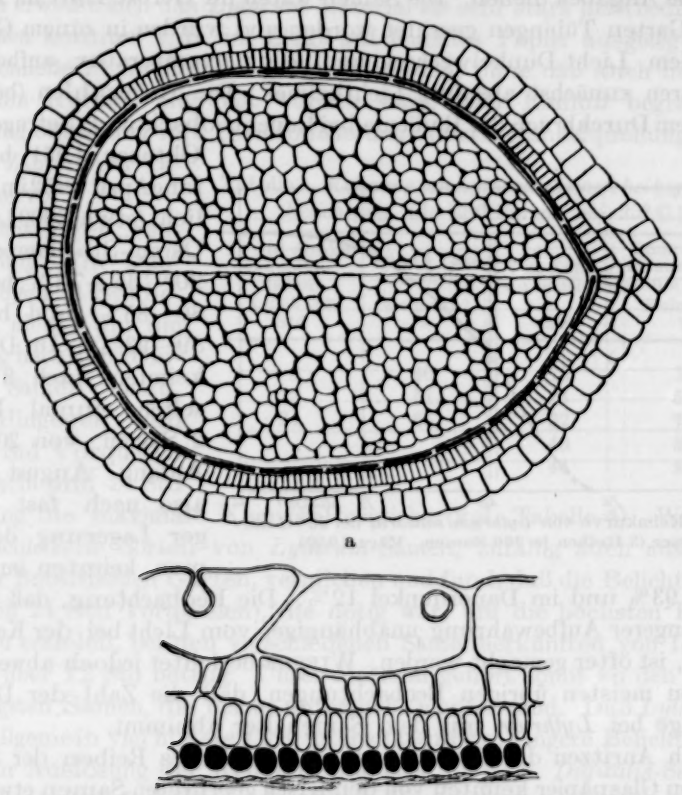


Abb. 1a u. b. a Längsschnitt (nicht genau median) durch den Samen von *Lythrum salicaria* (schematisch). b Schnitt quer zur Längsachse durch die Samenschale (oben ist außen). In der äußeren Zellschicht eingestülpte Haare. Die innerste Zellschicht mit braunem Inhalt.

der Innenzellen eine kräftig blaugrüne bis schwarzblaue Farbe. Die verdickten Zellwände der Innenschicht bleiben stets ungefärbt.

Auslaugen der Samen (mehrmals Abgießen während 24 Std) mit 1% NaOH oder mit 5% Salpetersäure gibt eine tiefbraune Lösung. Die Samen selbst nehmen dabei ebenfalls eine dunkelbraune Farbe an. Destilliertes Wasser und verdünnte Salzsäure (1—10%) lösen ebenfalls Substanzen aus den Samen, die nach Auftrennung im Papierchromatogramm Polyphenolreaktion geben. Da die Samen sich nach diesen Extraktionen, sofern sie nicht bis zur Schädigung getrieben wurden,

nicht wesentlich anders bei der Keimung verhielten als unbehandelte, unterließen wir zunächst eine weitere Beschäftigung mit den Inhaltsstoffen, deren „Gerbstoff"natur erwiesen war.

Zur weiteren Charakteristik der verwendeten Samenprobe mögen folgende Angaben dienen. Die Samen waren im Herbst 1951 im Botanischen Garten Tübingen geerntet worden und wurden in einem Glas bei normalem Licht-Dunkelwechsel und Zimmertemperatur aufbewahrt. Sie waren zunächst absolute Lichtkeimer. Die Keimzahlen (beurteilt nach dem Durchbruch der Radicula bei Lupenbeobachtung) betrugen vom Oktober 1951 bis Anfang April 1952 im Dauerlicht (etwa 2000 Lux von Osram-Stablampen) bei 20° C 65—73%; bei 23° C 80—85% und bei 26° 89—93%. Im Dunkeln keimten nach 8 Tagen selten einmal 1 oder 2 Samen von 200 aus. Anfang August 1952, also nach fast 1jähriger Lagerung der Samen, keimten im Licht bei 26° 93% und im Dauerdunkel 12%. Die Beobachtung, daß Samen nach längerer Aufbewahrung unabhängiger vom Licht bei der Keimung werden, ist öfter gemacht worden. Wieser berichtet jedoch abweichend von den meisten übrigen Beobachtungen, daß die Zahl der Dunkelkeimlinge bei *Lythrum* mit dem Samenalter abnimmt.

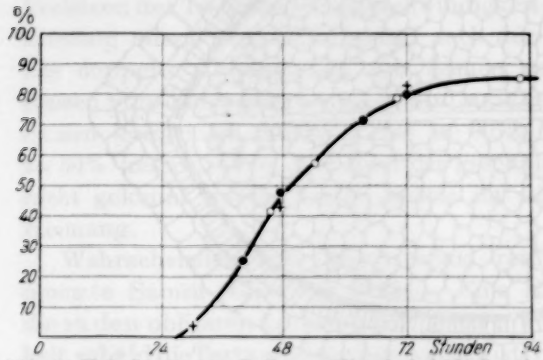


Abb. 2. Keimkurve von *Lythrum salicaria* bei 23° C auf Wasser (3 Reihen je 200 Samen, März 1952).

Nach Anritzen der Samenschale durch leichtes Reiben der Samen zwischen Glaspapier keimten von den frisch geernteten Samen etwa 50% im Dunkeln. Ein Teil der behandelten Samen war offenbar geschädigt worden, denn auch im anschließenden Dauerlicht ließ sich nicht die höchste Keimzahl erzielen. Über das Auskeimen unbehandelter Samen im Dauerlicht gibt Abb. 2 Auskunft. Die Werte wurden an verschiedenen Tagen im März 1952 mit jeweils 200 Samen in Petrischalen auf Papier, das mit destilliertem Wasser befeuchtet war, unter den oben genannten Lichtbedingungen erhalten. Drei nebeneinander angesetzte Portionen zu je 100 Samen im Dauerlicht ergaben nach 5 Tagen 82, 81 und 79% Keimung. Zahlreiche Wasserkontrollen, die zusammen mit den noch zu beschreibenden Versuchsreihen angesetzt und ausgezählt wurden, zeigten, daß sowohl der Beginn der Keimung als auch die Dauer bis zum Erreichen der maximalen Keimzahl mit einer gewissen Amplitude schwanken können, ohne allerdings das prinzipielle Verhalten zu ver-

ändern. Der Steilheit der Keimkurve ist zu entnehmen, daß das Samenmaterial ziemlich einheitlich war (vgl. RESÜHR 1939a).

Verglichen mit einer Tabakrasse, mit der wir häufiger experimentierten, und einer in wenigen Versuchen geprüften Rasse von *Digitalis purpurea* erweist sich das *Lythrum*-Material als sehr stark lichtbedürftig. Die Samen konnten z. B. im Licht auf feuchtes Papier ausgelegt und erst anschließend ins Dunkel gebracht werden, ohne daß auch nur ein Same zum Keimen angeregt worden wäre. Der Einfluß begrenzter Belichtung ohne oder mit „Sensibilisierung" durch Dunkelquellung geht aus den Zahlen der Tabelle 1 hervor.

Tabelle 1. *Keimung von Lythrum-Samen bei begrenzter Belichtung.* (Je 200 Samen bei 23° C.)

24 Std dunkel gequollen, darauf Licht für Std	Dann 4 Tage dunkel Keimzahl %	Von Anfang an belichtet Std	Dann dunkel bis zum Ende von 5 Tagen Keimzahl %
8	40	16	36
12	51	24	52
24	65	32	76
		40	80
		44	82

Bei eintägiger „Sensibilisierung" im Dunkeln genügen 24 Std Belichtung nicht, um die Keimung bei allen keimfähigen Samen auszulösen. Hingegen wird nach 48 Std Vorquellen im Dunkeln und 24 Std Belichtung die maximale Keimzahl erreicht (vgl. Tabelle 4). WIESER hat verschiedene Sorten von *Lythrum*-Samen, zufällig auch aus dem Tübinger Botanischen Garten, verglichen und fand, daß die Belichtungszeit (nach 24 Std Vorquellen), die nötig war, um die höchsten Keimzahlen zu erzielen, bei den verschiedenen Samenherkünften von 15 min bis weit über 12 Std betrug. Unser Material gehört somit zu den lichtbedürftigsten Samen, die bisher untersucht worden sind. Daß *Lythrum*-Samen allgemein viel höhere Lichtintensitäten bzw. längere Belichtungszeiten zur Auslösung der Keimung brauchen als z. B. *Digitalis*-Samen, wurde schon mehrfach beobachtet (vgl. MEISCHKE).

Obwohl nach den in Tabelle 1 aufgeführten Zahlen keine Gefahr bestand, wenn die Dunkelportionen kurz weißes Licht erhielten, sollte doch eine noch weniger wirksame Lichtquelle gesucht werden, weil bei Atmungsversuchen und bei anderen Manipulationen mit den Dunkelsamen manchmal für kurze Zeit Belichtung nötig war. Unter farbigen Gläsern, von denen das grüne ein Durchlässigkeitsmaximum bei 530 mμ hatte, das rote die Wellen von 600 mμ und länger und das blaue ab 500 mμ und kürzer durchließ (alle ließen zudem noch das langwellige Rot ab 730 mμ beträchtlich durch), keimten von je 200 Samen bei 26° (bzw. 20°) nach 4 Tagen Dauerlicht folgende Anteile aus: farbloses Licht 89% (73%), rot 85% (60%), grün 24% (14%) und blau 14% (7%). Wenn bei den Versuchen Dunkelsamen umgebettet werden mußten, geschah das immer im Blaulicht, ebenso wurden die Vorbereitungen

für die Atmungsbestimmungen dunkel gehaltener Samen bei schwachem Blaulicht durchgeführt.

Die fördernde Wirkung von Temperaturschwankungen ist öfter im Zusammenhang mit der Lichtkeimung beobachtet worden. Unsere Dunkelversuche wurden zwar meist bei der in den bekannten Heraeus-Thermostaten gewährleisteten Temperaturkonstanz durchgeführt, obwohl das *Lythrum*-Material auch gegen Temperaturschwankungen recht unempfindlich war. Wenn im Lichtraum manchmal während einer Versuchsreihe merkliche Temperaturschwankungen (mehr als $\pm 1^0$) auftraten (was bei ungewöhnlichen Beanspruchungen des Raumes vorkommen konnte) reagierten *Nicotiana*-Samen stets rasch mit erhöhter Keimung, während *Lythrum* nie wesentlich abweichende Keimzahlen gegenüber konstanten Bedingungen ergab. Diese hohe Unempfindlichkeit des Materials hatte für das Experimentieren Vorteile, denn geringe Temperaturunterschiede zwischen dem Thermostaten und dem Wasserbad des Warburg-Apparates waren nicht zu vermeiden. Daß die Keimzahl mit steigender Temperatur sich erhöht und bei 26^0 vielleicht nicht einmal ihren höchsten Wert erreicht hat, braucht nicht mit der Lichtwirkung zusammenzuhängen. Die höhere Temperatur (ebenso wie Temperaturschwankungen) ist eine Bedingung, die unabhängig vom Licht als Voraussetzung für das Wachstum des Embryos erfüllt sein muß. Das geht auch daraus hervor, daß sie bei lichtunempfindlichen Samen in der gleichen Weise wirksam sind (z. B. bei *Poa pratensis*, Gassner 1930). Für Lichtkeimer wird diese Deutung durch das Verhalten der Samen von *Ranunculus sceleratus* gestützt (Gassner 1915b). Licht bei konstanter Temperatur wirkt bei ihnen nicht keimungsauslösend, aber Belichtung bei konstanter Temperatur und anschließende Temperaturschwankungen im Dunkeln führen zu maximalen Keimzahlen. Der Lichteinfluß kann sich bei konstanter Temperatur auswirken; die Temperaturschwankungen sind unabhängig vom Licht nötig. Das zeigt sich noch deutlicher, wenn die bei konstanter Temperatur und deshalb ohne Auskeimen belichteten Samen getrocknet und erst später im Dunkeln zum Keimen ausgelegt werden. Auch dann keimen sie nur bei Wechseltemperaturen. Das Licht kann auch bei so tiefen Temperaturen mit Erfolg geboten werden, bei denen gar keine Keimung möglich ist (siehe auch unten!). Bei obligaten Lichtkeimern (eine Rasse von *Arabidopsis thaliana*) ruft intermittierende Temperatur nur bei *un*genügend nachgereiften Samen also bei noch nicht voll keimfähigen Embryonen, eine Erhöhung der Keimzahl hervor und das nur im Licht; ohne Belichtung ist die Wechseltemperatur auch hier unwirksam (Kugler). Ebenso wird beim Bahiagras die Samenschale für die Keimung erst zum begrenzenden Faktor, wenn die Samen genügend nachgereift sind (Hodgson).

Tabelle 2. *Wasseraufnahme von Lythrum-Samen im Licht und im Dunkeln bei 23° C* (50 mg Einwaage, Wasseraufnahme in Milligramm).

Dauerlicht		Dunkel
1 Std 12,5 mg	18 Std 25,0 mg	12 Std . . . 24,0 mg
2 Std 18,0 mg	24 Std 25,5 mg	24 Std . . . 23,5 mg
4 Std 20,0 mg	31 Std 24,0 mg	31 Std . . . 24,5 mg
6 Std 25,0 mg	48 Std 33,0 mg[1]	4 Tage . . 24,5 mg
		31 Std dann
		12 Std hell 25,0 mg

[1] Etwa 40% ausgekeimt!

Auf die Quellung der *Lythrum*-Samen hat das Licht keinen entscheidenden Einfluß, wie aus Tabelle 2 hervorgeht. Je 50 mg lufttrockene Samen wurden in Petrischalen auf feuchtem Filtrierpapier wie bei den übrigen Versuchen ausgelegt, nach den entsprechenden Zeiten mit trockenem Filtrierpapier rasch abgetupft und in kleine Gläser gefüllt, die verstopft und auf der Torsionswaage gewogen wurden. Die Wasseraufnahme ist zunächst nach etwa 6 Std beendet. Erst wenn der Embryo anfängt zu wachsen und die Keimwurzel die Samenschale durchstößt, wird wieder Wasser aufgenommen, denn nach 48 Std im Licht haben etwa 40% der Embryonen die Testa gesprengt. Im Dunkeln erreicht der Wassergehalt zunächst die gleiche Höhe wie bei der Quellung im Licht, aber er bleibt dort stehen, weil kein Wachstum der Embryonen einsetzt. Daß die über die Anfangsquellung hinausgehende Wasseraufnahme mit dem Embryonenwachstum zusammenhängt, geht auch daraus hervor, daß sie zeitlich mit dem aus Abb. 2 ersichtlichen Beginn der ersten sichtbaren Keimung zusammenfällt. Ganz ähnliche Verhältnisse sind von Grohne für *Digitalis* nachgewiesen worden, wo durch die einsetzende Stärkebildung noch gezeigt werden konnte, daß lange vor dem von weiterer Wasseraufnahme begleiteten Auskeimen andere Erscheinungen durch die Lichtwirkung ausgelöst wurden. Wir haben keinen Grund, die über die Anfangsquellung hinausgehende Wasseraufnahme als primäre Lichtwirkung anzusehen.

B. Einwirkung von Chemikalien auf die Keimung.

Da wir aus verschiedenen Gründen vermuteten, daß die in den Samenschalen enthaltenen Polyphenole („Gerbstoffe") etwas mit dem Mechanismus der Lichtkeimung zu tun haben könnten, interessierten die Wirkungen, die typische Gerbstoffreagentien auf die Keimung ausüben. Am nächsten lag, den Einfluß von $FeCl_3$ auf die Keimgeschwindigkeit und Keimzahl der lichtbedürftigen Samen zu prüfen. Merkwürdigerweise sind Eisensalze unter den vielerlei Agentien, die man zur Keimstimulation benutzt hat, selten zu finden. Niethammer konnte bei

Chelidonium majus, einem relativen Lichtkeimer, die ziemlich niedrige Keimzahl im Licht von 15% mit 0,12—2% Ferrisulfatlösung auf 65 bis 75% erhöhen. Auch im Dunkeln wurden statt 5% (Kontrollen auf Wasser) 35% mit Fe-Salz erhalten. Die Versuche fanden allerdings bei stark wechselnden Temperaturen statt. Uns ist es nicht gelungen, die

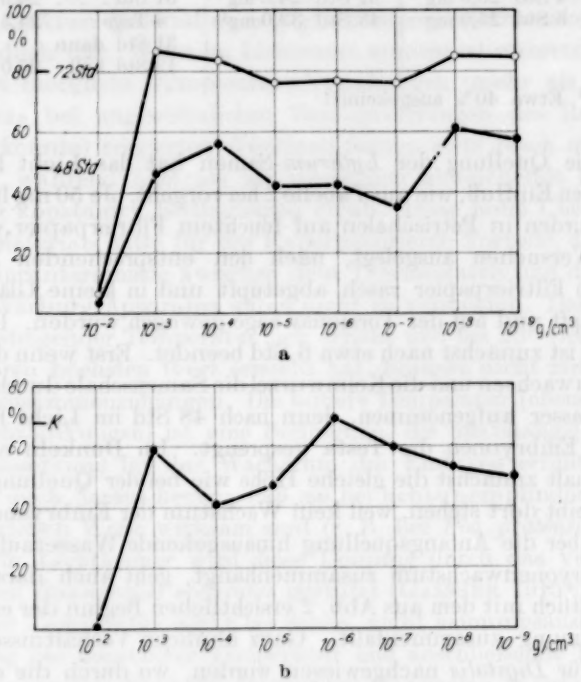


Abb. 3a u. b. a Keimgeschwindigkeit von *Lythrum*-Samen auf $FeCl_3$-Lösungen verschiedener Konzentration. Je 100 Samen bei 23° C im Dauerlicht. Die untere Kurve nach 48 Std, die obere nach 72 Std. Die Keimprozente der Wasserkontrolle sind an der Ordinate markiert. b Keimzahlen von *Digitalis purpurea*-Samen auf $FeCl_3$-Lösungen verschiedener Konzentration. Jeder Punkt ist der Durchschnitt aus 2mal 200 Samen bei 23° C im Dauerlicht nach 5 Tagen. Die Keimprozente der Wasserkontrolle sind auf der Ordinate markiert.

Keimung der vorliegenden *Lythrum*-Rasse durch $FeCl_3$ im Dunkeln auszulösen. Es muß aber noch offen bleiben, ob bei anderen weniger lichtbedürftigen Rassen ähnlich wie in den Versuchen von NIETHAMMER auch die Dunkelkeimung zu beschleunigen oder die Keimzahl zu erhöhen ist. Die Abb. 3a und b geben den Einfluß verschiedener $FeCl_3$-Konzentrationen auf die Keimung von *Lythrum*- und *Digitalis*-Samen im Dauerlicht wieder. Die Samen wurden in Petrischalen auf Filterpapier ausgelegt, das mit den Lösungen getränkt war. Der Effekt ist merkwürdig. Besonders auffällig ist das Oszillieren zwischen relativer Hemmung und Förderung der Keimgeschwindigkeit bei monoton abfallenden Konzentrationen des Eisenchlorids. Bei *Digitalis* handelt es sich verglichen

mit den Wasserkontrollen nur um Hemmzonen, denn die höchsten Werte liegen nicht über den Kontrollen, während bei *Lythrum* in den ersten Tagen der Keimung bei bestimmten Konzentrationen eine Überlegenheit gegenüber den auf Wasser keimenden Samen besteht. Am Ende (bei *Digitalis* nach 8 Tagen, bei *Lythrum* nach 4 Tagen) erreichen alle Portionen mit Ausnahme der höchsten Konzentration (10^{-2} g/cm³) die gleichen Keimzahlen. Es wird also nicht die Keimzahl, die im Licht schon maximal ist, sondern die Keimgeschwindigkeit beeinflußt. Die relativ fördernden Konzentrationen sind nicht exakt festzulegen. Die erste (höhere) Konzentration lag bei 10^{-3} oder bei 10^{-4}, die zweite meistens bei 10^{-6}, sie konnte aber auch bis 10^{-8} verschoben sein. Bei den zahlreichen Versuchsreihen, die wir gerade mit $FeCl_3$ ausgeführt haben, fand sich aber stets eine zweite fördernde Konzentration. Daß diese nicht genauer bestimmt werden konnte, liegt wohl an der bekannten Instabilität wäßriger Ferrichloridlösungen, die im Kontakt mit dem Fließpapier und der Testa der Samen noch erhöht sein mag. Bei *Digitalis*-Samen bilden die niedrigsten verwendeten Konzentrationen noch eine weitere (dritte) Hemmzone gegenüber der Wasserkontrolle. Tatsächlich haben wir auch in anderen Versuchen manchmal noch eine deutliche Wirkung bis 10^{-11} g/cm³ gefunden.

Bemerkenswert ist das Bild, das die Samen im Keimbett mit den $FeCl_3$-Lösungen bieten. Bei 10^{-2} g/cm³ (= 1%), sind fast keine Substanzen, die Eisenchloridreaktion geben, auf das Filtrierpapier ausgetreten, aber die Samen selbst erscheinen tiefviolett gefärbt. Im Gegensatz dazu treten bei 10^{-3} und 10^{-4} violett gefärbte Höfe um die Samen auf. In den Wasserkontrollen sind die aus den Samen diffundierenden Substanzen braun gefärbt. Von 10^{-5} g $FeCl_3$/cm³ ab und bei den stärkeren Verdünnungen bleiben die Höfe ebenfalls braun. Auf $KMnO_4$ Lösungen erscheinen um die Samen ausgebleichte Höfe als Zeichen dafür, daß die ausgetretenen Stoffe oxydierbar sind. Beim Anblick der dunkel gefärbten Samen auf 10^{-2} g $FeCl_3$/cm³ könnte man vermuten, daß die völlige Hemmung der Keimung im Licht auf mangelnden Lichtzutritt zum Sameninneren zurückzuführen wäre. Jeder Same ist gewissermaßen in eine dunkle Hülle gekleidet. Wir glauben jedoch nicht, daß damit die richtige Erklärung gefunden ist, denn *Nicotiana*- und *Digitalis*-Samen sind von Natur aus so dunkel pigmentiert, daß dort die gleichen Bedingungen für den Lichtdurchtritt herrschen, die bei der hohen $FeCl_3$-Konzentration künstlich geschaffen wurden. Wesentlicher scheint die Beobachtung, daß bei der völlig hemmenden hohen Konzentration keine gerbstoffähnlichen Substanzen austreten, daß sie entweder ganz an der Lösung verhindert oder durch das Eisenchlorid zu unlöslichen Komplexen gebunden werden. Für eine Erklärungsmöglichkeit der anderen Förderungs- und Hemmzonen läßt sich aus der Beobachtung des Aus-

sehens der Samen kein Anhaltspunkt finden. Es ist zunächst überhaupt schwer, eine Erklärung für das Auftreten einer Förderung (bei *Lythrum*) und einer Hemmung (bei *Digitalis*) bei den beiden Konzentrationen 10^{-4} und 10^{-8} bis 10^{-9} mit dazwischenliegender indifferenter bzw. entgegengesetzt wirkenden Konzentrationen zu finden. Man muß wohl vermuten, daß 2 verschiedene wirksame Systeme vorliegen, von denen das eine auf die höhere Konzentration anspricht, die ihrerseits das andere, auf die niedere Konzentration ansprechende vielleicht in der gleichen Weise ausschaltet, wie die höchste Konzentration (10^{-2}) alle beide Systeme nicht zur Wirkung kommen läßt. Welcher Art die auf $FeCl_3$ ansprechenden Systeme sein könnten, soll später noch erörtert werden. Hier ist auf die Untersuchungen zu verweisen, in denen die Abhängigkeit der Oxydation von Polyphenolen durch Luftsauerstoff von Fe-Ionen geklärt wurde. Molekularer Sauerstoff ist als schwacher H_2-Akzeptor gerade fähig, aromatische Oxy- und Aminoverbindungen zu oxydieren Dabei fördern Eisenionen. Die Autoxydation von Hydrochinon und anderen Polyphenolen in Gegenwart von Eisensalzen führt zu Gleichgewichten auf Grund der reversiblen Reaktion:

$$\text{Hydrochinon} + 2\,Fe^{\cdot\cdot\cdot} \rightleftharpoons \text{Chinon} + 2\,Fe^{\cdot\cdot} + 2\,H^{\cdot}$$

Das Gleichgewicht hängt von der Konzentration der H-Ionen und der Reaktionsteilnehmer, also vor allem der Eisensalze ab (Wieland und Franke; Franke). Die fördernde Wirkung bestimmter Eisensalzkonzentrationen auf die Keimgeschwindigkeit wird auf alle Fälle auf die Samenschale ausgeübt, denn sobald die Wurzel die Testa durchbrochen hat, wird auch von den auf die Keimung günstig wirkenden Konzentrationen, z. B. 10^{-3}, das Wurzelwachstum außerordentlich stark gehemmt oder sogar ganz unterbunden.

Die völlige Hemmung der Keimung bei 10^{-2} g $FeCl_3/cm^3$ beruht nicht auf einer Vergiftung oder Schädigung der Samen. Wenn sie auf wassergetränktes Filtrierpapier übertragen werden, keimen sie fast bis zum Prozentsatz der Wasserkontrollen aus. Atmungsbestimmungen, die in Abb. 4 zusammengefaßt sind, bestätigen, daß die Samen durch die relativ hohen Eisenchloridkonzentration nicht geschädigt worden sind. Der Gasumsatz wurde im Warburg-Apparat gemessen. Die Samen lagen auf Filtrierpapierringen, die in die Gefäße eingelegt und mit den entsprechenden $FeCl_3$-Konzentrationen getränkt worden waren. Die Samen auf der hohen Konzentration wurden 66 Std nach dem Auslegen auf Streifen umgebettet, die mit destilliertem Wasser befeuchtet waren. Zwischen den Atmungsbestimmungen standen die Gefäße unter den oben genannten Lichtbedingungen. Der minimale, gerade mit der Methode noch meßbare Gasumsatz der Samen auf 10^{-2} ist der gleiche, den auch Samen im Dauerdunkel zeigen.

Ganz ähnliche Einflüsse auf die Geschwindigkeit der Lichtkeimung, wie in Abb. 3a dargestellt, wurden auch mit verschiedenen Konzentrationen von K-Ferrocyanid bei *Lythrum* gefunden. Keinen Effekt riefen p-Dimethylaminobenzaldehyd und Vanillin-Salzsäure hervor, wahrscheinlich weil beide nur in stark saurer Lösung mit Gerbstoffen reagieren.

Die Wirksamkeit der Eisensalze legte die Vermutung nahe, daß auch andere Redoxverbindungen einen Einfluß auf die Keimung im Licht haben könnten, zumal die entscheidende Bedeutung des Lichtes bei der Keimung lichtempfindlicher Samen ganz allgemein in einer Reduktion im chemischen Sinne gesehen worden ist (BÖHMER). Fast

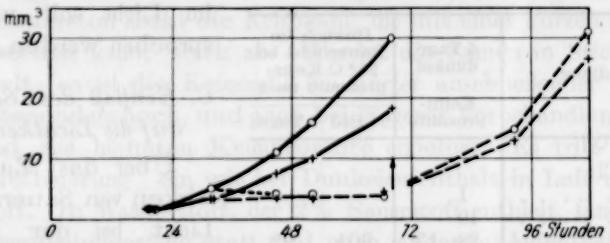


Abb. 4. Gasstoffwechsel von *Lythrum*-Samen, die auf verschiedene $FeCl_3$-Konzentrationen ausgelegt worden waren. o——o Sauerstoff; +——+ Kohlendioxyd, auf 10^{-3} g $FeCl_3$/cm³. o·····o Sauerstoff, +·····+ Kohlendioxyd, zunächst auf 10^{-3} $FeCl_3$, dann bei ↑ auf destilliertes Wasser übertragen. Dauerlicht (Gasaustausch im Dunkeln gemessen), 24° C, Gasmengen für 1 Std und 200 Samen.

alle geprüften Redoxsysteme und oxydierenden Substanzen (Safranin T, Neutralrot, Methylenblau, 2,6-Dichlorphenol-indophenol, Ascorbinsäure, $KMnO_4$, KNO_3, $AgNO_3$) hatten in einem weiten Konzentrationsbereich von 10^{-2} bis 10^{-9} g/cm³ im Dunkeln gar keinen und im Dauerlicht keinen bemerkenswerten Einfluß auf Keimzahl und Keimgeschwindigkeit. Eine geringe Förderung der Keimgeschwindigkeit hatte im Licht Safranin T bei 10^{-3} bis 10^{-5}. $AgNO_3$ hemmt im Licht bei 10^{-2} vollständig und bei 10^{-3} noch sehr stark. $KMnO_4$ hat auch im Licht keinen Einfluß. NIETHAMMER hatte mit Mn^{II}-Salzen bei *Verbascum thapsiforme* im Licht die relativ niedrige Keimzahl beträchtlich erhöhen können. Eigene Versuche mit $MnSO_4$ und *Lythrum* ergaben im Dauerlicht keine ausgesprochen fördernden Konzentrationen. Abschließend soll hier festgehalten werden, daß die Salze, die in irgendeiner Weise die Lichtkeimung beeinflußten, als Kationen Metalle hatten, die in verschiedenen Wertigkeiten auftreten können (Fe, Mn) und damit also oxydierend-reduzierend wirken, oder als Anion NO_3' und NO_2' hatten, die ebenfalls oxydierend wirken können.

Nur mit sehr drastischen Mitteln gelang es, einen geringen Prozentsatz unseres *Lythrum*-Materials, das sich, wie schon angedeutet, in jeder Hinsicht als recht unempfindlich erwies, auch im Dunkeln zum Keimen zu bringen. Die vorher trockenen Samen wurden mit den in Tabelle 3

genannten Flüssigkeiten unter gelegentlichem Umschwenken im Dunkeln stehengelassen, dann mehrmals mit Wasser gewaschen und auf Fließpapier, das mit Wasser getränkt war, ausgelegt. Die Manipulationen wurden im Blaulicht ausgeführt. Nach 5 Tagen Dunkelaufenthalt wurden die Schalen ins Licht gestellt, um festzustellen, ob die Samen etwa geschädigt worden waren, was bei der längeren Behandlung mit HCl tatsächlich geschehen war. Alkohol (96%ig) hatte eine ähnliche Wirkung wie Aceton (15% Dunkelkeimer). Über die möglichen inneren Ursachen für die Keimungsauslösung im Dunkeln und der erhöhten Keimgeschwindigkeit im Licht soll unten gesprochen werden.

Tabelle 3. *Auslösung der Keimung von Lythrum-Samen im Dunkeln nach Vorbehandlung* (jeweils 200 Samen).

Behandlung	5 Tage dunkel Keimprozente		Danach im Dauerlicht bei 26° C Keimprozente nach 24 Std	3 Tagen
25%ige HCl:				
15 min	1		—	—
30 min	10		—	—
1 Std.	28	13	60[1]	92
2 Std.		2		14
Aceton:				
1 Std	7	12	62[1]	90
2 Std	10			91
6 Std	8			—
Vanillin-HCl:				
20 min	12	13		—
1 Std.	4			15
2 Std.	0			1

[1] Beschleunigung des Auskeimens im Licht verglichen mit anderen, im Dunkeln vorgequollenen Samen.

C. Einfluß des Sauerstoffs auf die Lichtkeimung.

Über das Zusammenwirken von Sauerstoff und Licht bei der Keimung lichtempfindlicher Samen liegen in der Literatur zahlreiche Angaben vor (Gassner, Wieser, Böhmer, Axentjew, Tilly u. a.), die jedoch mehr Aufmerksamkeit verdienen, als ihnen bisher gezollt wurde; denn von allen untersuchten Faktoren hat variierte Sauerstoffkonzentration in der die Samen umgebenden Luft stets einen entscheidenden Einfluß neben dem Licht ausgeübt. Die Wirkung des Sauerstoffs könnte auf den ersten Blick etwas verwirrend erscheinen. Speziell für *Lythrum salicaria*, in ähnlicher Weise aber für Lichtkeimer allgemein, wurde folgendes festgestellt. 1. Lichtgeförderte Samen erleiden durch erhöhten Sauerstoffpartialdruck eine starke Hemmung (Erniedrigung der Keimprozente), die jedoch durch steigende Lichtmengen mehr und mehr rückgängig gemacht werden kann (Böhmer). Lichtindifferente Samen sind hingegen gegen hohe Sauerstoffkonzentrationen unempfindlich, so daß also nicht etwa das Wachstum der Embryonen an sich sauerstoffgehemmt ist. 2. Andererseits wird aber die keimungsauslösende Wirkung des Lichtes auch im luftverdünnten Raum abgeschwächt. Bei weniger Sauerstoffgehalt, als etwa $^1/_5$ der normalen Atmosphäre entspricht, geht

trotz genügender Belichtung die Keimzahl zurück (WIESER). Wenn der gleiche Autor dann aber aus seinen Versuchen glaubt ablesen zu dürfen, daß auch bei völliger Sauerstoffabwesenheit das Licht doch keimungsauslösend wirken könne, so hat er nicht beachtet, daß nach seinen eigenen Feststellungen das Licht für eine gewisse Zeit nachwirkt. Er hat aber unmittelbar nach Beendigung der Belichtung im evakuierten Raum wieder den vollen Sauerstoffgehalt der Luft geboten, in der dann die Nachwirkung des Lichtes die Keimung ausgelöst haben dürfte. Im übrigen treffen seine Voraussetzungen über die Intensität der Atmung dunkler Samen nicht zu, so daß der Sauerstoff nie völlig entfernt war. 3. Bei längerer Dunkelvorbehandlung (Sensibilisierung) in Luft oder reinem Sauerstoff sinkt die Keimzahl, die mit einer kurzen Belichtung erzielt werden kann, stark ab. Werden die Samen in Stickstoff vorverdunkelt, so ist die Keimzahl bei kurzer anschließender Belichtung in Luft besonders hoch, und auch bei längerer Vorbehandlung in Stickstoff sind die höchsten Keimprozente erzielbar. Es tritt also keine „Desensibilisierung" ein wie bei Dunkelaufenthalt in Luft und reinem Sauerstoff. In Wasserstoff, der 2% Sauerstoff enthielt, fand ebenfalls keine Desensibilisierung statt und nach längerem Aufenthalt in dieser Atmosphäre keimen auffallend viele Samen schon im Dunkeln, während in normaler Atmosphäre keine Dunkelkeimung vorkam (TILLY). Zusammengefaßt läßt sich also sagen, daß einerseits der Sauerstoff besonders in hohen Konzentrationen der Lichtwirkung entgegenarbeitet, daß andererseits aber die Lichtwirkung ohne geringe Mengen von Sauerstoff nicht eintreten kann und daß Wasserstoff in gewissem Umfang die Lichtwirkung ersetzen kann.

Es war deshalb wissenswert, wieweit unsere Samen auf veränderten Sauerstoffgehalt der Atmosphäre ansprechen, und insbesondere interessierte festzustellen, ob die Lichtwirkung sich ohne bzw. bei geringer Sauerstoffversorgung überhaupt manifestieren kann. Im Hinblick auf die schon mehrfach erwähnte relative Unempfindlichkeit unseres Materials konnte auch hierbei wieder erwartet werden, daß geringe O_2-Konzentrationen das prinzipielle Verhalten weniger stören würden als bei anderen lichtempfindlicheren Rassen und Arten. Die Versuche wurden deshalb so angesetzt, daß die unter verminderter Sauerstoffspannung zu behandelnden Proben auf feuchtes Fließpapier in Thunberg-Röhrchen kamen, die dann an der Wasserstrahlpumpe evakuiert wurden. Bei längerer Aufbewahrung dieser evakuierten Gefäße wurde täglich erneut abgesaugt, so daß das Wasserstrahlpumpen-Vakuum tatsächlich erhalten blieb. Ihm entspricht ein Sauerstoffgehalt von etwa 0,4%. Das Evakuieren allein hat keinen bemerkenswerten Einfluß auf die Samenkeimung (WIESER).

Je 200 Samen wurden bei 26° C 48 Std in normaler Atmosphäre dunkel zum Quellen ausgelegt, um volle „Sensibilisierung" zu erreichen.

Nach dem Evakuieren beider Proben kam die eine 48 Std ins Licht; die Parallelprobe wurde weiterhin dunkel gehalten. Nach dieser Zeit waren weder in der hellen noch in der dunklen Partie Samen ausgekeimt. Bei Luftzutritt würden nach dieser Zeit etwa 70% im Licht gekeimt haben. Die beiden Portionen kamen anschließend in normale Atmosphäre und in Licht, um zu sehen, ob die Belichtung im sauerstoffarmen Raum den Samen einen Vorsprung gegenüber den während der gleichen Zeit verdunkelten gewährt. Das ist nicht der Fall, denn nach 24 Std Aufenthalt in Luft und Licht waren 50 bzw. 51% und nach 48 Std 93 bzw. 89% gekeimt. Es war nicht zu erwarten, daß während der Belichtung im sauerstoffarmen Raum die Keimung in Gang kommt, weil für das Wachstum im allgemeinen Sauerstoff nötig ist, aber die Belichtung ohne Sauerstoff hätte gegenüber einer entsprechenden Dunkelperiode die anschließende Keimung rascher eintreten lassen können. Die Befunde sprechen jedoch dafür, daß das Licht nur bei Anwesenheit von Sauerstoff keimungsauslösend wirkt.

Tabelle 4. *Keimung von Lythrum-Samen nach Vorbehandlung und Belichtung im sauerstoffarmen Raum.* (Je 100 Samen in Thunberg-Röhrchen, 26° C, evakuierte Röhrchen = $-O_2$, normale Atmosphäre = $+O_2$.)

	Zunächst 48 Std dunkel	Dann 24 Std Licht	Keimprozente nach weiteren 4 Tagen dunkel in Luft %
a	$-O_2$	$-O_2$	18
b	$-O_2$	$+O_2$	93
c	$+O_2$	$-O_2$	11
d	$+O_2$	$+O_2$	89
e	48 Std Licht		
	$-O_2$	$-O_2$	11

Ein erweiterter Versuch wurde angesetzt, um zu prüfen, ob die Belichtung im sauerstoffarmen Raum zur Keimung beim anschließenden Dunkelaufenthalt in normaler Luft genügt. Die Tabelle 4 gibt die Resultate wieder.

Aus diesen Zahlen geht hervor, daß nach 48 Std Dunkelvorbehandlung ganz gleich ob in normaler oder sauerstoffarmer Atmosphäre und anschließender *Belichtung in Luft* die maximalen Keimprozente erreicht werden (b und d). Unabhängig von der Vorbehandlung vermag *Belichtung im sauerstoffarmen Raum* nur bei einer geringen Zahl von Samen die Keimung auszulösen (a, c und e). Wir dürfen wohl annehmen, daß die wenigen auch unter diesen Bedingungen keimenden Samen solche sind, für die die geringe anwesende Sauerstoffkonzentration genügt, um den Lichteffekt zu ermöglichen. Die geringen Keimprozente bei a, c und e wären aber auch dadurch erklärbar, daß die Belichtung noch für einige Zeit im Dunkeln nachwirkt, wofür Wieser Beispiele gegeben hat. Selbst 72 Std Belichtung im sauerstoffarmen Raum (e) genügen nicht, um bei anschließendem Dunkelaufenthalt die Keimung bei einer größeren Zahl von Samen in Gang zu bringen. Die in Tabelle 4 zusammengefaßten Daten sprechen also dafür, daß bei der Dunkelvorbehand-

lung („Sensibilisierung") die Anwesenheit von Sauerstoff nicht erforderlich ist (b) und daß die Belichtung nur bei Sauerstoffgegenwart den keimungsauslösenden Effekt ausüben kann (b und d).

Gaswechselmessungen, die im Zusammenhang mit der Lichtkeimung bisher nur von KIPP und SCHRÖPPEL in einiger Ausführlichkeit angestellt worden sind, schienen uns geeignet festzustellen, ob die Belichtung im sauerstoffarmen Raum nicht doch irgendeinen Effekt auf die Auslösung der Keimung ausübt. Um ein zu dichtes Belegen zu vermeiden, konnten in jedes Gefäß des Warburg-Apparates nicht mehr als 200 Samen gebracht werden. Meist wurde 1 Gefäß nur mit 100 Samen beschickt. Die Samen lagen auf Fließpapier und blieben während der ganzen Versuchszeit in den Gefäßen, wenn keine andere Behandlung vorgesehen war, d. h. die Gefäße mit den Samen wurden in der Zeit zwischen den Gaswechselmessungen unter einer feuchten Glocke entweder belichtet oder verdunkelt stehen gelassen. Alle Manipulationen mit verdunkelten Samen wurden wiederum bei schwachem Blaulicht ausgeführt. Das Bild der „normalen" Atmung, d. h. der in normaler Atmosphäre bei Dauerlicht bzw. Dauerdunkel gehaltenen Samen bietet Abb. 5. Bis 24 Std nach dem Einquellen ist der Gaswechsel im Licht und im Dunkeln unbedeutend. Bei den nichtkeimenden Samen (Dunkelheit oder 10^{-2} g $FeCl_3/cm^3$, s. oben) bleibt ein minimaler Gasumsatz bestehen. Merkliche Wandlungen in diesem Gasaustausch, etwa ein schwaches Ansteigen und Abfallen wie bei KIPP, konnten wir mit den geringen Mengen und der angewandten Methode nicht feststellen. Ein intensiverer Gasumsatz beginnt bei den belichteten Samen (die nicht $FeCl_3$-gehemmt sind!) ungefähr 24 Std nach Auslegen, also nicht lange, bevor die ersten Wurzeln die Testa durchbrechen.

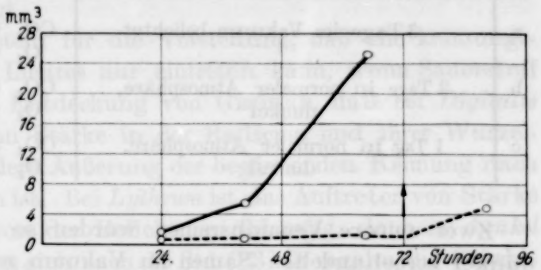


Abb. 5. Sauerstoffaufnahme von *Lythrum*-Samen, die belichtet und verdunkelt zum Keimen ausgelegt worden sind. O——O im Licht; O— — —O dunkel, bei ↑ ins Licht gebracht. 24° C, Gasumsatz im Dunkeln gemessen; Ordinate: mm³ O_2/Std und 200 Samen.

Anlage und Ergebnisse eines ersten Versuches über den möglichen Einfluß der Belichtung im sauerstoffarmen Raum auf die spätere Atmung der Samen sind aus Tabelle 5 zu ersehen. Das „Angehen" der Atmung in den ersten 24 Std Belichtung in normaler Atmosphäre ist trotz der verschiedenen Vorbehandlung sehr ähnlich; auf keinen Fall eilt die Atmung der im evakuierten Raum vorbelichteten Samen denjenigen voraus, die vor der Belichtung im Dunkeln bei Sauerstoffgegenwart

gehalten worden waren. Die Keimzahl nach 24 Std „normaler Belichtung" der bei Sauerstoffentzug vorbelichteten Samen läßt keinen Vorsprung vor den dunkel sensibilisierten Samen erkennen.

Tabelle 5. *Gasumsatz von Lythrum-Samen nach Vorbelichtung im Vakuum. Die Werte für O_2 und CO_2 bedeuten mm³ je 2 Std bei 24° C für 100 Samen* (a und b Durchschnitt aus 2 Serien je 200 Samen; Versuche vom 8. April 1952).

	Vorbehandlung	Danach in normaler Atmosphäre belichtet für		Keimzahl nach 24 Std Belichtung in Luft
		12 Std	24 Std	%
a	3 Tage im Vakuum belichtet	CO_2 6,6 O_2 6,6	11,0 12,6	8
b	3 Tage in normaler Atmosphäre, dunkel	CO_2 6,0 O_2 6,0	9,2 13,2	17
c	1 Tag in normaler Atmosphäre, dunkel	CO_2 5,2 O_2 5,2	8,2 9,0	15

Zwei weitere Versuchsreihen wurden so angesetzt, daß auch die dunkel vorbehandelten Samen im Vakuum gehalten wurden. Je 4mal 100 Samen waren 48 Std bei 26° auf feuchtes Fließpapier ausgelegt. a) belichtet im Vakuum, b) dunkel im Vakuum, und 2mal 100 Samen dunkel in normaler Atmosphäre. Da im Warburg-Apparat für die O_2- und CO_2-Bestimmung je eine Probe gebraucht wird, gibt das bei den evakuierten Portionen jeweils 2 Parallelen, für die in Luft vorverdunkelte aber nur einen Wert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Daß die Atmung und damit die Keimung im Vakuum nicht in Gang kommen kann, ist nicht verwunderlich. Wichtig ist, daß die im Vakuum *vorbelichteten* Samen sich in nichts vor den dunkel im Vakuum gehaltenen

Tabelle 6. *Gasumsatz von Lythrum-Samen, die im Vakuum bei Licht oder im Dunkeln vorbehandelt worden waren. Die Werte für O_2 und CO_2 geben mm³ je 2 Std bei 24° C für 100 Samen an.* (Versuche von Ende Juli bis Anfang August 1952.)

Belichtung in normaler Atmosphäre für	Nach 48 Std Vorbehandlung bei 26° C und								
	Licht im Vakuum			Dunkel im Vakuum			Dunkel in Luft		
	CO_2	O_2	RQ	CO_2	O_2	RQ	CO_2	O_2	RQ
5 Std	etwa 1	etwa 1	1	etwa 1	etwa 1	1	etwa 1	etwa 1	1
10 Std	4,0	4,0	1	3,6	4,0	0,9	7,1	8,1	0,88
24 Std	7,6	10,8	0,7	7,2	11,3	0,64	9,1	17,6	0,52
48 Std	25,9	53,8	0,48	23,9	50,6	0,47	24,0	54,0	0,44
Keimzahlen:									
nach 24 Std		25%			30%			60%	
nach 48 Std		81%			75%			93%	

auszeichnen. Licht ohne Sauerstoff vermag die Keimung nicht auszulösen. Der geringe Vorsprung der bei Sauerstoffgegenwart vorverdunkelten Samen kann vielleicht damit erklärt werden, daß zu dieser Jahreszeit (Ende Juli bis Anfang August 1952) etwa 15% der Samen schon im Dunkeln keimen. Der RQ fällt unabhängig davon, ob bei der Vorbehandlung im Vakuum belichtet oder verdunkelt worden war, von etwa 1 auf 0,47—0,48 nach 48 Std ab. Auch nach diesem Merkmal beurteilt, hat die Belichtung ohne gleichzeitige Sauerstoffanwesenheit keinen Effekt. Da der absinkende RQ als Anzeichen für die Mobilisierung von Fett anzusehen ist (vgl. auch PAECH und EBERHARDT), darf geschlossen werden, daß die Belichtung nicht unmittelbar diese Mobilisierung beschleunigt.

Einen weiteren Prüfstein für die Vorstellung, daß die keimungsauslösende Wirkung des Lichtes nur eintreten kann, wenn Sauerstoff anwesend ist, bietet die Entdeckung von GROHNE, daß bei *Digitalis purpurea* die Bildung von Stärke in der Radicula und ihrer Wurzelhaube früher als jede andere Äußerung der beginnenden Keimung nach Belichtung zu beobachten ist. Bei *Lythrum* ist das Auftreten von Stärke in der Kalyptra nicht von der Belichtung abhängig, denn in *dunkel* gequollenen Samen finden sich nach 16 Std (23° C) regelmäßig Stärkekörner, während 5 Std nach dem Auslegen in das Keimbett noch keine Stärke sicher nachweisbar ist. Bei einer Tabakrasse („Virgin" aus Forchheim) war 48 Std (bei 23° C) nach Beginn der Belichtung noch keine Stärke zu sehen, aber nach 66 Std war die Reaktion in der Wurzelkappe eindeutig positiv. Hier scheint die Stärkebildung also viel träger auf die Belichtung zu reagieren als bei *Digitalis*-Samen, mit denen wir deshalb einige Versuche unter Ausschluß des Sauerstoffes, d. h. im Vakuum der Wasserstrahlpumpe, anstellten. Die Samen wurden 48 Std im Dunkeln „sensibilisiert" und dann entweder in normaler Atmosphäre oder im Vakuum belichtet. Nach 6 Std Belichtung fand sich in 2 von 25 Samen in Luft Stärke, während die im Vakuum belichteten keine Stärke hatten. Nach 24 Std und 36 Std Belichtung hatten alle Keimlinge in Luft reichlich Stärke gebildet, während die im Vakuum immer noch keine enthielten. Auch hierbei ist also Sauerstoffanwesenheit die Voraussetzung dafür, daß das Licht die erste sichtbare keimungsauslösende Wirkung vollbringen kann. Dieser Versuch hat allerdings keine beweisende Kraft dafür, daß die primäre Lichtwirkung den Sauerstoff braucht, denn die Umwandlung von Fett in Stärke ist ein oxydativer Vorgang, der bei Sauerstoffmangel auf alle Fälle ausbleiben würde.

Schließlich haben wir noch einige Versuche angesetzt, um zu zeigen, daß die Lichtwirkung nicht an einem Vorgang der Keimung im engeren Sinne, also des Embryowachstums, angreifen muß. In Erweiterung der bereits erwähnten Versuche von GASSNER mit *Ranunculus sceleratus* und

von Resultaten, die Tilly bei anderen Absichten erhalten hat, haben wir die Lichtwirkung und den Beginn der Keimung durch Anwendung niederer Temperatur zu trennen versucht. Es ist zu erwarten, daß knapp über 0° C die Keimung praktisch unterdrückt wird, während eine photochemische Reaktion durch Temperatursenkung bekanntlich nicht stark verzögert wird. Selbst wenn neben der photochemischen noch eine „normale" chemische Reaktion mit einem Q_{10} von 2—3 an der Lichtwirkung beteiligt sein sollte, etwa eine nichtenzymatische Oxydation, muß man erwarten, daß auch diese noch mit meßbarer Geschwindigkeit abläuft, während das Wachstum des Embryos und sein Stoffwechsel bei hinreichend tiefen Temperaturen nicht in Gang kommt. Je 200 Samen kamen in Petrischalen auf feuchtes Fließpapier und wurden in einen belichteten Kühlschrank bei $+3°$ bis $+5°$ C gestellt. Parallelproben wurden in dem gleichen Kühlschrank verdunkelt gehalten. Nach 3 Tagen kamen sowohl die belichteten als auch die verdunkelten Kontrollen ins Dunkel bei 26° C, um zu prüfen, ob die Belichtung trotz der noch ruhenden Embryonen genügt hat, die Keimungsbedingungen im anschließenden Dunkelaufenthalt zu schaffen. Nach 4 Tagen Keimzeit bei 26° (dunkel) ergaben sich folgende Keimprozente: nach Vorbehandlung bei $+3°$ bis $+5°$ hell 71%, nach Vorbehandlung bei 3° bis 5° dunkel 19%. Die Probe, die während der 7 Tage hell im Kühlschrank geblieben war, gab keine Keimung. Die 19% Keimlinge unter den dunkel vorbehandelten Samen sind die für Anfang August bei unserer *Lythrum*-Rasse üblichen Dunkelkeimer, deren Keimung also nicht etwa durch die Kältevorbehandlung ausgelöst zu werden braucht. Die Steigerung auf 71% durch Belichtung bei tiefer Temperatur, bei der kein Wachstum des Embryos bemerkbar ist, muß der Wirkung des Lichtes unabhängig von „einleitenden Keimungsprozessen" zugeschrieben werden. Der Effekt der Aufbewahrung im Licht bei tiefen Temperaturen ist nicht der sog. Stratifikation zuzuschreiben (deren Mechanismus man ja auch noch nicht kennt); denn die parallellen Dunkelproben, die der gleichen „Stratifikation" unterlagen, keimen nicht besser als unvorbehandelte Samen.

III. Auswertung.

Wir dürfen davon ausgehen, daß bei *Lythrum* in der Samenschale das keimungshemmende Hindernis liegt, das durch die Lichtwirkung beseitigt werden muß. Das geht hinreichend eindeutig daraus hervor, daß Samen mit verletzter Testa auch im Dunkeln keimen. Außerdem sind die Versuche, in denen ein gewisser Prozentsatz nach 1stündiger Behandlung mit konzentrierter Salzsäure im Dunkeln zur Keimung und zwar zu normalem Wachstum, nicht zu „falscher Keimung" gebracht wurde, nur so zu deuten, daß die Säurewirkung an der Testa

ansetzt, weil der Embryo konzentrierte Salzsäure nicht überstehen würde. Daß nach dieser unsanften Behandlung nicht die höchstmögliche Keimzahl erreicht wird, liegt sicher daran, daß die Einwirkungszeit, die nötig ist, um die Samenschale gerade durchlässig zu machen, nicht bei allen Samen genau gleich ist. Die Samen, deren Schale einmal durchdrungen ist, fallen alsbald der schädigenden Wirkung der Salzsäure zum Opfer. Die Behandlung mit konzentrierter Säure bringt nur so lange steigende Keimprozente, wie mehr Samenschalen aufgelockert als Embryonen schon durch eingedrungene Säure geschädigt werden. Die maximalen Keimzahlen sind mit diesem drastischen Eingriff deshalb nie zu erreichen. Bei *Verbascum thapsiforme* erhöhte die Behandlung trockener Samen mit starken Säuren die Keimfähigkeit im Dunkeln, ohne in die Samen eingedrungen zu sein (HESSE). Die keimungsauslösende Wirkung rauchender Schwefelsäure (Behandlung 40—60 min) beim Bahiagras *(Paspalum notatum)* kann wohl ebenfalls nur an der Testa angreifend gedacht werden (HODGSON; vgl. auch STONE und GUHREN). Bei Samen von *Juniperus virginiana* kann ein Bad von 30 min in konzentrierter Schwefelsäure die sonst nötige Wärmebehandlung von 2 Wochen ersetzen; es macht aber die Stratifikation (Behandlung bei tieferen Temperaturen) nicht überflüssig. Diese Samen sind insofern von besonderem Interesse für unsere Frage, als bei ihnen 2 Hemmsysteme vorliegen, eines im Embryo und eines in der Samenschale. Die Hemmung in der Samenschale wird durch die Vorbehandlung bei höherer Temperatur bzw. mit konzentrierter Schwefelsäure aufgehoben. Die im Embryo vorhandene Hemmung wird durch die Stratifikation beseitigt (BARTON).

Bei *Nicotiana-* und *Digitalis*-Samen, jedenfalls bei den von uns herangezogenen Rassen, wirkt das Licht zwar auch auf die Samenschale ein, die Unterschiede im Verhalten sind gegenüber *Lythrum* aber so beträchtlich, daß daneben ähnlich wie bei den embryogehemmten Samentypen ein Effekt auch auf das Innere des Samens in Betracht kommt. Diese Samen können nicht einfach durch Verletzen der Samenschale zum Keimen im Dunkeln gebracht werden (vgl. auch GROHNE). Hingegen gehört offenbar *Chloris ciliata* streng zu dem schalengehemmten Typ, weil dort das keimungshemmende Hindernis durch Entfernung der Spelzen beseitigt werden kann, an denen das Licht angreift (GASSNER 1915b).

Bei den Samen von *Lythrum* und anderen samenschalengehemmten Lichtkeimern muß eine „Sperrschicht" bestehen, die durch das Licht aufgebrochen wird. Dieses Hindernis steht offenbar nicht der Wasseraufnahme im Wege, denn die Quellung geht unabhängig vom Licht vor sich, und erst wenn der Keimling schon durch andere Anzeichen, meist schon durch Sprengung der Testa, zum Wachstum übergegangen ist, wird weiter Wasser aufgenommen. Es liegen viele Angaben dafür

vor, daß Samenschalen schwer durchlässig für Gase sein können und daß Sauerstoff dabei besonders benachteiligt ist. „Durch vegetabilische Membranen diffundiert CO_2 rascher als Wasserstoff und dieser wieder rascher als Sauerstoff" (WIESNER und MOLISCH). Bei *Sinapis alba* bildet die Samenschale ein Hindernis für die Sauerstoffdiffusion. Die Samen könnten mehr O_2 verbrauchen, als ihnen bei normaler Sauerstoffkonzentration und selbst bei 50% O_2 in der Außenatmosphäre zur Verfügung steht (STÅLFELT). „Vermutlich leidet der Samen an einem gewissen Sauerstoffmangel, solange die Kotyledonen noch fest von der Samenschale umschlossen sind". Nach eingehender Untersuchung des Gasaustausches von Erbsensamen mit und ohne Samenschale in den ersten Tagen der Keimung kommt FRIETINGER zu dem Schluß, daß die Samenschale die Schuld an einer intramolekularen Atmung in dieser Periode trägt, da sie dem Sauerstoff den Durchtritt erschwert, wenn nicht ganz unmöglich macht. Erst eine allmähliche Veränderung der Samenschale beseitigt dieses Hindernis. Daß die Testa von *Cucurbita*-Samen eine für Sauerstoff schwer durchlässige Schicht enthält, wurde oben schon erwähnt (BROWN). Leider sind die Samen der Lichtkeimer alle so winzig, daß mit der abgelösten Testa keine Untersuchungen über die Gasdurchlässigkeit angestellt werden können. AXENTJEW bringt weitere Beobachtungen und Argumente dafür bei, daß die dem hier behandelten Typ von Lichtkeimern zugehörigen Samen (bzw. Früchte) unter Sauerstoffmangel leiden und daß die Samenschale den Gaszutritt hemmt. Er glaubt allerdings nicht, annehmen zu dürfen, daß die Samenschale, die zur Hauptsache aus toten Zellen besteht, unter dem Einfluß diffusen Lichtes oft von unbedeutender Intensität imstande ist, sich so zu verändern, daß in einigen Fällen die Permeabilität für Sauerstoff größer wird (Lichtkeimer). Es soll gleich gezeigt werden, wie durch Vermittlung der in Samenschalen vorhandenen Polyphenole die von ihm für unwahrscheinlich gehaltenen Veränderungen zustande gebracht werden können.

Der Sauerstoff kann also eher als das Wasser bei der Samenkeimung der „begrenzende Faktor" sein. Es soll hier nochmals darauf hingewiesen werden, daß erhöhte Sauerstoffkonzentration die Lichtwirkung hemmen kann. Man darf also nicht einfach annehmen, daß die Lichtwirkung durch erhöhte Sauerstoffkonzentration ersetzt werden könne. Die Zusammenhänge sind etwas komplizierter, weil das Licht einerseits dem Sauerstoff den Weg zum Embryo öffnet, weil aber andererseits der Sauerstoff am Substrat der Lichtwirkung einen hemmenden Vorgang auslösen kann.

Daß dem Embryo für das Wachstum Sauerstoff zur Verfügung stehen muß, versteht sich fast von selbst. Keimung in Anaerobiose ist im allgemeinen nicht möglich, wenn das Sauerstoffbedürfnis verschiedener

Samenarten auch recht verschieden hoch sein kann. Wasserpflanzen können mit sehr geringen Mengen ihr Wachstum beginnen (vgl. PETRUCCI), und auch unter den Landpflanzen gibt es manche, die noch bei starker Reduktion der Sauerstoffversorgung zu keimen vermögen (vgl. CROCKER). Daß *Lythrum* Sauerstoff zum Keimen braucht, geht aus allen Versuchen hervor, bei denen trotz langer Belichtung im Vakuum keine Keimung eintrat.

Die Frage nach dem Mechanismus der Lichtwirkung bei samenschalengehemmten Lichtkeimern spitzt sich also darauf zu, *wie das Licht die in der Testa vorhandene Sperrschicht für Sauerstoff brechen kann.* Diese Barriere ist bei *Lythrum* wahrscheinlich in den verdickten Wänden der innersten kleinlumigen Zellen zu suchen (vgl. Abb. 1). Die dicken gequollenen Zellulosemembranen sind offenbar von so dichter Struktur, daß unpolare Gasmoleküle nicht bzw. nur außerordentlich langsam passieren können. Die bessere Diffusion von CO_2 ist dabei verständlich. Daß Samenschalen tatsächlich Schichten von Zellen mit ungewöhnlich dichten und deshalb sogar für Wasser zunächst impermeablen Zellulosewänden enthalten können, ist durch elektronenmikroskopische und polarisationsoptische Untersuchungen an *Gleditschia*-Samen gezeigt worden (CAVAZZA).

Welche plausiblen und nahegelegenen Möglichkeiten gibt es, die Sauerstoffdurchlässigkeit gequollener Zellulosewände zu erhöhen? Man muß daran denken, daß sich an Zellulosemembranen ähnliche Vorgänge abspielen können wie bei der Gerbung von Eiweißmembranen. Man pflegte bisher kaum von „Zellulosegerbung" zu sprechen, aber auf das Prinzipielle der Gerbung gesehen darf der Begriff auch auf die Zellulose ausgedehnt werden. Das ist nicht überraschend, wenn die Gerbung in einer Austauschadsorption von Gerbstoffen gegen Wasser an den Adsorptionsstellen der Eiweiße besteht (vgl. z. B. BATZER und WEISSENBERGER). Gerbstoff blockiert die Hydratationszentren des Eiweißes. Das Wasser wird weitgehend durch Gerbstoff ersetzt. Die Gerbung ist also eine dehydratisierende Weichmachung. Alle diese Vorgänge sind an Zellulosemicellen ebensogut möglich. Die Aufnahme von Phenolen durch Zellulose ist auch schon genauer untersucht worden (vgl. BRASS und GRONYCH). Im Hinblick auf die weiteren Überlegungen soll hier gleich erwähnt werden, daß die durch Veresterung polymerisierte Digallussäure in viel höherem Maße aufgenommen wird als die Gallussäure selbst.

„Gerbstoffe" sind in den Extrakten aus Samenschalen und in den Samenschalen selbst öfters nachgewiesen worden (vgl. dazu auch MASQUELIER). Daß in der Testa von *Lythrum*, und zwar gehäuft im Lumen der dickwandigen inneren Zellen aber *nicht in den Zellwänden* selbst, Substanzen vorkommen, die die üblichen Gerbstoffreaktionen geben, wurde oben mitgeteilt. Diese histochemischen Reaktionen sprechen aber

ganz allgemein auf Polyphenole an, denn mit Vanillin und p-Dimethylaminobenzaldehyd reagiert Phloroglucin kräftig, mit $FeCl_3$ gibt Kaffee- und Chlorogensäure grüne und Gallussäure blaue Färbung. Alle diese einfachen Polyphenolmoleküle sind aber nicht Gerbstoffe im eigentlichen Sinne des Wortes. Sie können als Gerbstoffvorstufen fungieren, die erst durch Polymerisation zu wirksamen gerbenden Verbindungen werden. Gerbstoffe sind abgeleitete Naturstoffe. Was die Pflanzenzellen zunächst produzieren, sind verschiedene Polyphenole, die erst nach Polymerisation, meist durch Kondensation, zu wirklichen Gerbstoffen werden. Die Übergänge sind gleitend. Leider gibt es keine einfachen chemischen Reaktionen, die die Vorstufen der Gerbstoffe von Gerbstoffen eindeutig zu unterscheiden gestatten. Die häufig benutzten Fe-Salze sind mehrdeutig. In Extrakten gibt die Adsorption an Hautpulver ein technisches Maß für Gerbstoffe ab.

Weder die Chemie der natürlichen Polyphenole noch viel weniger ihre Photochemie sind so gut erforscht, wie es als Grundlage für die Aufklärung der Lichtkeimung erwünscht wäre. Eine der jüngsten Übersichten über natürliche Gerbstoffe (Russell) zeigt, wie mager die Kenntnisse der Biochemie dieser Gruppe von Polyphenolen sind. Es liegen jedoch genügend Anhaltspunkte für eine konkrete Vorstellung von den Vorgängen in der Samenschale vor.

Die in der Lichtkeimungsforschung mit „Sensibilisierung" bezeichnete Phase der Vorbehandlung der Samen, d. h. ein mehr oder weniger langes Einquellen im Dunkeln, bedeutet für die folgenden photochemischen Umwandlungen die Bereitstellung des Systems, an dem die Lichtwirkung ansetzt. Die wasserlöslichen Anteile der im Zellumen ausgeschiedenen Massen von Polyphenolen werden aufgelöst und die Zellwände werden mit diesen Gerbstoffvorstufen imbibiert. Die Anwesenheit bestimmter gelöster Stoffe ist eine wesentliche Voraussetzung für die Lichtwirkung, denn ausgelaugte, ausgewässerte Samen sind im Licht weniger gut keimfähig als die nichtgewässerten, was nicht leicht verständlich wäre, wenn das Licht nur einen Hemmstoff zu beseitigen hätte. Die Auflösung braucht eine gewisse Zeit, denn viele in Frage kommende Polyphenole, z. B. Kaffeesäure, sind nur schwer wasserlöslich. In normaler Atmosphäre erreicht die Sensibilisierung bald ein Optimum, danach werden die Samen wieder unempfindlicher für die Lichtwirkung. Diese „Desensibilisierung" bleibt in Stickstoff- und Wasserstoffatmosphäre aus (Tilly). Es handelt sich bei ihr also um Vorgänge, die das für die Lichtwirkung vorhandene Substrat oxydativ entwerten.

Daß Polyphenole lichtempfindlich sind, ist eine allgemein bekannte Tatsache. Phloroglucin, Pyrogallol u. a. werden deshalb in braunen Flaschen aufbewahrt! Sie werden, obwohl sie als reine Substanzen im sichtbaren Licht nicht selektiv absorbieren, vom Licht verändert,

da sie sowohl in Substanz als besonders in den natürlichen Quellen stets mit geringen Mengen ihrer Oxydationsprodukte, den gelb oder braun gefärbten chinoiden Stufen, vergesellschaftet sind. Eine zunächst völlig ungefärbte wäßrige Lösung von 1% Phloroglucin, das nicht frisch kristallisiert war, färbte sich am diffusen Tageslicht bei Zimmertemperatur schon in 24 Std gelblich und war nach 3 Tagen kräftig gelb geworden, während ein Teil der gleichen Lösung, der dunkel gestanden hatte, farblos blieb. In der gleichen Zeit war eine Phloroglucinlösung auch bei winterlichen Temperaturen zwischen -2^0 und $+5^0$ vor einem Südfenster gelb geworden, während die lichtdicht daneben stehende farblos geblieben war.

Als unmittelbare Lichtwirkung kämen lichtelektrische Effekte in Betracht, die nicht auf Metalle beschränkt sind und die bei biologisch vorkommenden Polyphenolen unter anderem bei Phloroglucin, Chinon und Eugenol in Substanz gemessen worden sind (vgl. auch für die folgenden photobiologischen Betrachtungen PINCUSSEN). Die Bedingungen, unter denen die Lösung eines beliebigen festen oder flüssigen Körpers photoelektrisch empfindlich ist, werden wie folgt angegeben: der gelöste Körper soll in Substanz photoelektrisch sein, die Lösung soll ultraviolette Strahlen kräftig absorbieren und sie soll kolloidal sein. Die lichtelektrische Erscheinung ist ein Oberflächeneffekt. Sie besteht in der Abgabe von Elektronen und bedeutet deshalb für die Redoxsysteme der Polyphenole den Übergang in eine höhere Oxydationsstufe. Die Voraussetzungen für das Eintreten dieses Effektes wären in Samenschalen durchaus gegeben. Alle Polyphenole haben wegen des Benzolrings im Molekül eine Absorptionsbande im UV (d-Catechin bei etwa 280 mμ, JOHNSON u. a.). Die Ausbreitung auf großen Oberflächen ist ein Charakteristikum der zellulären Struktur. Die Verteilung der in Frage kommenden Polyphenole auf der gequollenen Zellulose dürfte der Bedingung der kolloidalen Lösung entsprechen. Tannine sind meist „semikolloidal" gelöst.

Im allgemeinen sind jedoch die chemischen Erscheinungen, die sich unter dem Einfluß der Strahlung vollziehen, sekundäre Erscheinungen, denen als erste physikalische bzw. physikalisch-chemische vorausgehen. Sicher ist natürlich die Absorption der Strahlen, sehr wahrscheinlich sind auch lichtelektrische Erscheinungen an anderen Substanzen die Vorbedingungen, unter denen chemische Umsetzungen erst möglich werden. Bei ionisierenden Strahlen besteht eine solche vorausgehende Reaktion in der Zerlegung des Wassers in die Radikale OH und H, worauf die entstandenen freien Atome und Radikale zusammentreten oder auf die im Wasser gelösten Stoffe einwirken (vgl. WEISS, BURTON). Der atomare Wasserstoff reduziert geeignete Verbindungen. Damit stimmen verschiedene Beobachtungen überein, die dem Licht bei der

Keimung allgemein eine reduzierende Wirkung zuschreiben (z. B. Böhmer).

Zur Lichtabsorption muß natürlich ein Pigment vorhanden sein. Wenn auch die meisten hier in Betracht kommenden Polyphenole selbst nicht im Sichtbaren selektiv absorbieren, so sind die oxydierten Polyphenole, d. h. die entsprechenden Chinone, die für eine Reduktion ja auch nur in Frage kommen, stets gefärbt. Die chinoide Struktur ist ein klassisches Beispiel für eine chromophore Bindung. Fluoreszierende Verbindungen, die als Photosensibilisatoren besonders geeignet sind, wurden schon in einer ganzen Reihe von Samen nachgewiesen. *Lythrum*-Samen fluoreszieren bläulich-weiß und frische Acetonextrakte aus ihnen zeigen im Papierchromatogramm kräftige Fluoreszenz (vgl. auch Tilly).

Leicht nachweisbar ist die photochemische Reduktion einer gefärbten Verbindung beim Methylenblau. Verdünnte Methylenblaulösungen wurden durch Belichtung mit einer 500 Watt-Lampe bei 23° innerhalb von 6 Std entfärbt, während im Dunkeln nach dieser Zeit noch keine Ausbleichung nachweisbar war (Tamiya). Dabei ergab sich, daß die unter Wasserstoffatmosphäre belichteten Proben später bei Sauerstoffzutritt sich wieder bläuten, während die in Sauerstoffatmosphäre belichteten Lösungen sich nach der Lichtentfärbung nicht wieder zum Pigment oxydieren konnten. Für unsere Betrachtungen sind dabei die Wechselwirkungen von Licht mit oxydierenden und reduzierenden Gasen von Bedeutung. Wichtig ist weiterhin, daß die Lichtreduktion des Methylenblaues ganz unterdrückt werden konnte, wenn der Lösung geringe Konzentrationen von Chinon zugesetzt worden waren. Chinon hemmt also die Überführung des H-Atoms auf Methylenblau entweder, indem es den Wasserstoff selbst aufnimmt oder indem es das reduzierte Methylenblau wieder oxydiert oder in einer anderen noch nicht aufgedeckten Weise. Bemerkenswert ist dabei, daß eine oxydierte Verbindung die Reduktion einer anderen lichtabsorbierenden Verbindung verhindern kann. Mit solchen Verhältnissen muß bei dem Nebeneinander von verschiedenen Substanzen in den Pflanzenzellen gerechnet werden.

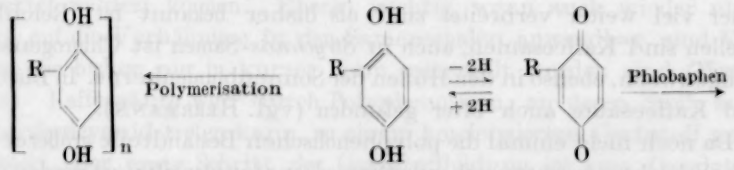
Eine einfache und übersichtliche photochemische Oxydoreduktion mit dem oxydierten Methylenblau und einer stark reduzierenden Verbindung hat früher einmal Weiland auf meine Anregung durchgeführt und beschrieben. Methylenblau und Ascorbinsäure reagieren im Dunkeln nur sehr träge, während im Licht die Reduktion des Methylenblaues auf Kosten der Ascorbinsäure in wenigen Minuten stattfindet. Es liegen also genügend Nachweise dafür vor, daß das Licht auch mit anderen Pigmenten als Chlorophyll rasche und kräftige Reduktionen durchführen kann.

Nach dem Zusammentreten der OH-Radikale des Wassers zu H_2O_2 können auch Oxydationen durch das Licht ausgelöst werden. Tatsäch-

lich scheinen viele lichtbedingte chemische Umsetzungen die Folge der Peroxydbildung zu sein. Diese Zwischenreaktion dürfte bei der Lichtkeimung jedoch keine Rolle spielen, denn H_2O_2 zum Außenmedium gegeben hemmt die Keimung im Dunkeln (BÖHMER). Dabei bleibt allerdings noch die Frage offen, ob unter den experimentellen Bedingungen das Peroxyd wirklich an die „richtige Stelle" kommt. Es zersetzt sich mindestens zum Teil an der rauhen Oberfläche der Samenschale.

Die bei der Photolyse des Wassers entstehenden Radikale können jedoch noch einen anderen für die Umwandlung von Polyphenolen wichtigen Vorgang auslösen, nämlich eine Polymerisation (vgl. EVANS und URI). „Eine ganze Reihe von Stoffen werden durch Licht polymerisiert. Sehr zahlreich sind die Beobachtungen über die Polymerisation organischer Stoffe. Weitaus größer als bei aliphatischen Verbindungen ist die Liste der aromatischen Körper, deren Polymerisation im Licht bekannt ist" (PINCUSSEN).

Wir dürfen also damit rechnen, daß das Licht direkt oder indirekt Oxydo-Reduktionsvorgänge und Polymerisationen in Gang bringt bzw. beschleunigt. Gerade für diese beiden Arten von Umsetzungen sind Polyphenole prädestiniert. Zeugen dafür finden sich in allgemein bekannten Vorgängen. Die Polyphenoloxydasen spielen in pflanzlichen Zellen eine Rolle als Endoxydasen im Atmungsstoffwechsel. Sie führen zu den braunen und schwarzen chinoiden Produkten nach Verletzen vieler pflanzlicher Gewebe, z. B. in angeschnittenen Äpfeln und Kartoffeln. Phlobaphene, die roten und braunen Borkenfarbstoffe, sind oxydierte und polymerisierte Polyphenole hauptsächlich vom Catechintyp. Schematisch kann man die Umsetzungen, denen Polyphenole unterliegen, etwa folgendermaßen darstellen:



Gerbstoff (b) Polyphenol (a) Chinoid

Als biologische Gerbstoffvorstufen kommen verschiedene Typen in Betracht. Weitverbreitet in Holz, Borke, Blättern, Wurzeln, Früchten und Samen sind die Catechine, d. h. Flavanderivate (zur Biochemie und Physiologie der Gerbstoffe vgl. PAECH 1950). Die Rotfärbung mit p-Dimethylaminobenzaldehyd-HCl wird als spezifisch für Phloroglucin und Catechine angesehen. Demnach enthält die Testa von *Lythrum* Catechine, von denen es mehrere Isomere gibt. Catechine sind in der Testa von *Aesculus hippocastanum* wahrscheinlich gemacht (BRAUNER)

und in der Samenschale von *Castanea sativa* nachgewiessn worden (O. Th. Schmidt, persönliche Mitteilung). In den Samenhäuten junger Walnüsse *(Juglans regia)* haben wir mit Eisenchlorid kräftige Blaufärbung und mit p-Dimethylaminobenzaldehyd eine tiefe Rotfärbung erhalten, so daß auch dort Catechine bzw. „Phloroglucingerbstoffe" angezeigt werden, die sich mit Aceton leicht extrahieren und anreichern lassen.

Catechin als einfaches Molekül hat höchstens schwach gerbende Eigenschaften. Erst durch Kondensation geht es in einen echten Gerbstoff über. Schon das Dimere wirkt gerbend. Es wird angenommen, daß die Polymerisation nicht an einem der Phenolhydroxyle ansetzt, sondern an dem Hydroxyl der 3-Stellung im Heterozyklus (oder nach Russell der 4-Stellung) (Bergmann und Pojarlieff).

Die Catechine unterliegen daneben noch einer anderen Umsetzung, nämlich der Oxydation zu schwer- oder unlöslichen kräftig gefärbten roten oder braunen Komplexen, den sog. Phlobaphenen, den Borkefarbstoffen, die keine gerbende Wirkung haben (Freudenberg und Mitarbeiter 1952, Freudenberg 1920 und 1933). Auch diese Umwandlung soll am Hydroxyl des Pyranringes ansetzen. Das Vorkommen von Catechinen als farblosen Vorstufen neben Gerbstoffen, die braun oder rötlich gefärbt sind, und den wasserunlöslichen Kondensationsprodukten ist in Samenschalen nachgewiesen (z. B. bei *Arachis hypogaea*, Masquelier).

Die Gallussäureester der Glukose, die eigentlichen Tannine, sind ein anderer weit verbreiteter Typ von Gerbstoffen, die besonders aus den Gallen bekannt sind. In Samenschalen ist dieser Typ unseres Wissens bisher noch nicht sicher nachgewiesen worden. Wichtiger für Samen sind wahrscheinlich die Gerbstoffe des Depsidtypes, von denen die Chlorogensäure und ihre phenolische Komponente, die Kaffeesäure, sicher viel weiter verbreitet sind als bisher bekannt ist. Reichliche Quellen sind Kaffeesamen, auch in *Strychnos*-Samen ist Chlorogensäure nachgewiesen, ebenso in den Hüllen der Sonnenblumenkerne. In Blättern wird Kaffeesäure auch öfter gefunden (vgl. Herrmann).

Da noch nicht einmal die polyphenolischen Bestandteile größerer und deshalb leichter zu untersuchender Samenschalen identifiziert worden sind, ist es nicht verwunderlich, daß über die in den lichtempfindlichen, stets relativ kleinen Samen vorliegenden Gerbstoffe und ihre Vorstufen kaum etwas bekannt ist. Von chemischer Seite „zogen die Gerbstoffe wegen ihrer technischen Bedeutung und ungewöhnlichen Natur bis vor etwa 20 Jahren die Aufmerksamkeit recht stark auf sich. In jüngerer Zeit sind sie jedoch etwas in Mißkredit gekommen" (Russell). Von biologischer Seite sind Gerbstoffe stets recht stiefmütterlich behandelt worden. Unter dieser Bezeichnung werden eine Reihe verschiedenartiger Körper zusammengefaßt, denen eigentlich nur die Eigenschaft gemeinsam ist,

mit $FeCl_3$ blaue oder grüne Färbung zu geben. „Die Bevorzugung der leicht anzustellenden mikrochemischen Farbreaktionen seitens der Botaniker anatomischer Richtung hat es mit sich gebracht, daß der Begriff der Gerbstoffe in der Botanik ein viel zu weiter und unbestimmter geworden ist. Gewöhnlich wird sogar nur nach dem Ausfall der Eisenprobe klassifiziert" (CZAPEK). Heute, 30 Jahre nach dieser kritischen Äußerung, hat sich noch nichts Wesentliches geändert, und auch die noch viel ältere Warnung, „daß es für die physiologische Chemie der Pflanzen von Nachteil ist, wenn in derselben das Wort „Gerbstoffe" in einem allgemeinen und wissenschaftlichen Sinne gebraucht wird" (REINITZER 1889) ist kaum beachtet worden.

Es gibt deshalb nur wenige Beobachtungen und experimentelle Daten, mit denen die Vorstellung über die photochemischen Veränderungen der natürlichen Polyphenole einerseits zu gerbenden Verbindungen andererseits zu indifferenten Phlobaphenen oder ähnlichen oxydierten Körpern direkt gestützt werden könnte. Eine recht interessante ältere Beobachtung muß hier erwähnt werden. Die Epidermis und die subepidermalen Schichten der hellen Weinbeeren enthalten zunächst im Zellsaft gelöste farblose Substanzen, die durch Sonnenlicht anfangs in etwas stärker lichtbrechende Tropfen und dann in sich braun färbende „festweiche" Massen verwandelt werden (MOLISCH). Der Inhalt der noch nicht verfärbten Zellen reagiert mit Vanillin-Salzsäure und gibt eine rote Färbung. Die braunen Klumpen reagieren nicht mehr wie Gerbstoffe. Ähnliche Umwandlungen ungefärbter gerbstoffähnlicher Verbindungen unter dem Einfluß des Sonnenlichtes sind jüngst in Epidermen anderer Früchte beobachtet worden (MILIČIC und BRAT). Daraus geht allerdings nur hervor, daß ungefärbte Zellinhaltsstoffe, die „Gerbstoffreaktion" geben, durch Licht kondensiert und in den genannten Fällen zu Phlobaphenen entwertet werden können. Ebenso wichtig, wenn auch wieder nicht direkt auf die Verhältnisse in den Samenschalen anwendbar, sind Versuche, die bisher nur in kurzer Form mitgeteilt worden sind (HERRMANN). Kaffeesäure wird durch Polyphenolasen, an deren Stelle auch Kaliumferricyanid treten kann, zu einem kondensierten Gerbstoff polymerisiert. Der erste Schritt der Gerbstoffbildung ist eine Oxydation zum o-Chinon, das aber nur vorübergehend auftaucht. Im Polymerisat, das durchschnittlich 4 Moleküle enthält und das die Reaktionen eines Gerbstoffes gibt, sind die Phenolhydroxyle wiederhergestellt. Kaffeesäure selbst ist kein Gerbstoff. Bei der Kondenation handelt es sich also prinzipiell um einen ähnlichen Vorgang wie bei der Polymerisation von Catechinen. Wenn auch die Lichtwirkung auf die Kondensation der Kaffeesäure noch nicht untersucht worden ist, so ist doch bemerkenswert, daß die Zusammenfügung der Moleküle durch Fe^{III}-Salze ausgelöst wird, deren Eingreifen in photochemische Reaktionen bei der

Lichtkeimung oben gezeigt wurde. Eisensalze haben eine stark beschleunigende Wirkung bei Lichtreaktionen, die sich nicht nur auf Oxydationen beziehen (Neuberg).

Die in der Testa von samenschalengehemmten Lichtkeimern, speziell von *Lythrum salicaria* sich abspielenden Vorgänge dürften also folgende sein. Die Gerbstoffvorstufen werden aufgelöst. Ein Teil diffundiert in das Keimbett. In den Zellulosewänden der Testa bilden sie das Redoxsystem (a) im Schema auf S. 553. Bei längerem Dunkelaufenthalt schreitet die Oxydation voran, die eine Desensibilisierung bedingt. Das Licht greift in dieses System in reduzierender Richtung ein. Je länger die Dunkelvorbehandlung gedauert hat oder je höhere Sauerstoffkonzentrationen in der Umgebung herrschen, um so größere Lichtmengen müssen zur Auslösung der Keimung geboten werden (Bihlmeier). Die Dunkelhärte wird durch die Bildung der irreversiblen Phlobaphene oder anderer chinoider Komplexe, die nach der Oxydation von vielen Polyphenolen allein oder zusammen mit Eiweißen (Melanine) oder Zellulose entstehen, bedingt. Einige eigene Tastversuche über 14 Tage, die aber offenbar noch nicht ausgedehnt genug waren, zeigen, daß Dunkelhärte nur bei Anwesenheit von Sauerstoff auftritt.

Da die Lichtauslösung der Keimung nicht eintritt, wenn kein Sauerstoff anwesend ist, muß die Polymerisation, die zum aktiven Gerbsystem führt, eine dehydrierende (= oxydative) Polymerisation sein. Analoge Vorgänge sind mit Coniferylalkohol studiert worden und liegen wahrscheinlich der Ligninbildung in Pflanzen zugrunde (Freudenberg 1949). Bei der Teefermentation wird eine oxydative Kondensation von Catechinen angenommen, wobei nach intermediärer Bildung von o-Chinonen die Moleküle durch Phenolätherbrücken verknüpft werden (Zaprametov). Die zu dieser oxydativen Polymerisation nötigen Sauerstoffkonzentrationen sind gering. Bei höheren O_2-Konzentrationen und längerer Einwirkung nimmt der in Richtung auf weiteroxydierte Chinone verlaufende Vorgang überhand. Für die Polymerisation müssen aber offenbar die reduzierten Polyphenole vorliegen. Die Versuche von Wieser über die Wirkung verschieden langer Dunkelaufenthalte bei verschiedenen Sauerstoffspannungen sind nicht eindeutig auswertbar, weil, wie schon Tilly bemerkte, die Samen nach der Belichtung unter den verschiedenen Sauerstoffverhältnissen verblieben, wodurch eine Trennung der während der Vorbehandlung eingetretenen Sauerstoffwirkung von derjenigen während der Belichtung und Keimung nicht möglich ist.

Für die Polymerisation genügt wahrscheinlich eine Induktion durch relativ geringe Lichtmengen. Der Kondensationsvorgang setzt sich dann auch bei nachfolgender Verdunklung fort, wenn genügend reduzierte Polyphenole vorhanden sind. Dort, wo die Lichtmenge ausschlaggebend

für die Keimzahl ist, dürfte die reduzierende Wirkung auf die chinoiden Körper zugrunde liegen (Vorgang a), dort, wo die höchste Keimzahl schon durch kurze Belichtung zu erzielen ist, wird nur die lichtinduzierte Polymerisation zum gerbenden System ausgelöst (Vorgang b). Bei einer Reihe von *Lythrum*-Rassen genügte in den Fällen die geringste Belichtung, um maximale Keimung auszulösen, wenn schon im Dunkeln eine hohe Keimzahl erreicht wurde (WIESER). Hier bedarf also die bei einem gewissen Prozentsatz der Samen schon im Dunkeln ablaufende Polymerisation bei den übrigen nur des Anstoßes durch das Licht. In vielen Fällen ist anzunehmen, „daß die Strahlung gewissermaßen als Beschleuniger wirkt, und so Prozesse, welche sonst in langsamer Zeit verlaufen würden, zu schnellerem Ablauf bringt" (PINCUSSEN S. 123). Bei den Samen, die mit fortschreitender Nachreife weniger lichtbedürftig werden, was häufig nachgewiesen wurde, findet im lufttrockenen Zustand, d. h. bei einem Wassergehalt von etwa 10%, eine allmähliche Polymerisation statt. Bei den Samen, bei denen mit dem Alter mehr Licht zur vollen Keimung nötig ist (den Ausnahmen), überwiegen die Oxydationen zu Phlobaphenvorstufen bzw. Chinonen. Auch dafür sind Beispiele aus der Praxis bekannt. Eichenrinde dunkelt an der Luft rasch nach. Nach 1—$1^1/_2$ Jahren ist die Hälfte der zunächst löslichen Gerbstoffe in unlösliche verwandelt worden. Quebrachogerbstoff ist besonders lichtempfindlich, das gilt auch für das mit Quebrachogerbstoff gegerbte Leder (BRIESKORN).

Das durch Polymerisation hergestellte gerbende System wirkt auf die stark gequollenen Zellwände der Sperrschicht in der Testa so weit entquellend, daß diese Membranen für Sauerstoff durchlässig oder durchlässiger werden, womit die keimungshemmende Barriere in der Samenschale durchbrochen ist. Die lichtinduzierte Bildung des aktiven Gerbstoffes ist also nur die Vorbereitung für den entscheidenden Schritt, der dem Sauerstoff den ungehemmten Zutritt zum lebenden Teil des Samens öffnet. Die äußerst geringe, bei uns gerade noch meßbare „Dunkelatmung" könnte so gedeutet werden, daß ein schwacher Gasaustausch durch die unveränderte Zellulosewand stattfindet, falls es sich dabei nicht nur um oxydative Vorgänge in der Samenschale handelt.

Für die hier ins Auge gefaßte Wechselwirkung zwischen Zellulosemembranen und Gerbstoffen existieren zunächst zwar noch keine direkten Beobachtungen und Unterlagen, wahrscheinlich weil diese Beziehungen für die menschliche Technik noch nicht von Bedeutung waren; aber verschiedene Analogien und bekannte Erscheinungen stützen die Vorstellung, daß die Struktur der Zellulosewand durch gerbende Einwirkung in der angenommenen Weise verändert wird.

Daß Polyphenole von Zellulosefasern aufgenommen werden können, wurde oben schon erwähnt. Dieser Vorgang spielt eine Rolle beim

Beizen und Färben der Zellulosegewebe mit bestimmten Farbstoffen. Im kristallinen Anteil der Zellulose der nativen Faser sind keine OH-Gruppen der Glukosereste für Umsetzungen frei. Im amorphen Anteil dagegen stehen die beiden Hydroxyle am 2. und 3. C-Atom der Glukose für chemische Reaktionen zur Verfügung (Lauer). Die wichtigste natürliche Umwandlung der nativen Zellulosewand, die hier als Analogon herangezogen werden muß, ist ihre Inkrustierung mit Lignin, das chemisch die größte Ähnlichkeit mit den polymerisierten Gerbstoffen des Catechintyps hat. Diese Einlagerung von Lignin, dessen genaue Verankerung an der Zellulose allerdings noch nicht bekannt ist, besteht im Prinzip in einer der „Gerbung" ähnlichen Belagerung der Quellungszentren der Zellulose. Lignin nimmt die für die Quellung entscheidenden Punkte des Zellulosemicells ein, die Quellbarkeit für Wasser wird dadurch herabgesetzt, die Wasserdurchlässigkeit aber ist gegenüber reiner Zellulose eher erhöht. Die von uns herangezogene Zellulosegerbung ist also ein der Ligninkrustierung ähnlicher Vorgang.

Eine andere Erscheinung, die jüngst studiert wurde, dürfte Beziehung zu den Funktionen der Gerbstoffe bei der Lichtkeimung haben. Phloroglukotannoide, die mit p-Dimethylaminobenzaldehyd kräftig rote Färbung geben, bilden mit bestimmten Farbstoffen (z. B. Acridinorange) auf Grund chemischer Bindung fluoreszierende Körper, solange diese Gerbstoffe gelöst sind. Sie zeigen aber Neigung zur Kondensation und werden dann ausgefällt und krümelig. In diesem Zustand vermag der „Gerbstoff" keinen Farbstoff mehr aufzunehmen (Härtel). Auch diese Erscheinung darf so ausgedeutet werden, daß Polyphenole, in diesem Falle wahrscheinlich auch vom Catechintyp, sich in gelöster Form leicht mit geeigneten organischen Substanzen eng verbinden; sie werden aber leicht zu wasserunlöslichen Aggregaten zusammengeballt, die dann unwirksam sind. In der *Pirola*-Epidermis wurden solche der Fluorochromierung fähigen Gerbstoffe auch in der Zellulosemembran wahrscheinlich gemacht.

Über einige Versuche zur Einwirkung von Gerbstoffen auf künstliche Zellulosemembranen wird Herr Dr. Dr. B. Weber gesondert berichten. Seine Ergebnisse bestätigen die hier angenommene Möglichkeit, daß die Behandlung stark gequollener Zellulosemembranen mit Gerbstoffen eine Struktur erzeugt, die dem Gasaustausch keine Hindernisse mehr in den Weg stellt.

Nachdem einleitend und laufend immer wieder betont wurde, daß ein „Same" ein recht heterogenes und komplexes System ist und daß das Licht dementsprechend verschiedene Ansatzpunkte findet, kann der Mechanismus der Lichtwirkung bei den samenschalengehemmten Typen der Lichtkeimer nach den heutigen Kenntnissen kurz folgendermaßen skizziert werden. In der Samenschale besteht eine Sperrschicht. Außer-

dem befinden sich in ihr lösliche Polyphenole, die im Dunkeln zu Phlobaphenen oxydiert werden. Aus den löslichen Polyphenolen, bei *Lythrum* wahrscheinlich vom Catechintyp, werden durch eine lichtinduzierte Polymerisation, die einen oxydativen Schritt einschließt, gerbende Produkte gebildet, welche die Zellwände der Sperrschicht so verändern, daß sie den Sauerstoffzutritt zum lebenden Teil des Samens ungehindert erlauben. Die Gerbstoffvorstufen werden durch das Licht, wahrscheinlich unter Vermittlung der H-Radikale aus Wasser, in reduziertem Zustand erhalten, oder, soweit sie reversibel oxydiert waren, in den reduzierten Zustand zurückgeführt. Der Sauerstoff greift dabei in zwei antagonistisch wirkende Vorgänge ein: einmal entwertet er die Gerbstoffvorstufen durch Oxydation zu unwirksamen Komplexen, die den Phlobaphenen ähnlich sind, und zum anderen ist er ein unerläßlicher Faktor bei der oxydativen Polymerisation der Vorstufen zu den aktiven Gerbstoffen. Schließlich sehen wir im Sauerstoff den Faktor, dessen Mangel die Keimung samenschalengehemmter Lichtkeimer im Dunkeln begrenzt. Es ist möglich, daß die erhöhte Durchlässigkeit nicht oder nicht ausschließlich den Sauerstoffdurchtritt begünstigt, sondern daß auch der Austritt hemmender Stoffe aus dem Sameninnern, etwa der Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels, entscheidend für den Fortgang der Keimung sein kann. Das würde im Grunde nichts an den wesentlichen Teilen der Lichtinduzierung einer Gerbstoffbildung und der gerbenden Wirkung auf die Zellwände ändern.

Tilly hat zwar Tanninlösungen auf *Lythrum*-Samen einwirken lassen, ohne höhere Keimprozente im Dunkeln zu erhalten. Die Betrachtung des Querschnittes durch die Testa (Abb. 1) lehrt, daß die äußeren Zellschichten den Durchtritt der „semikolloiden" Tanninlösungen zu der Sperrschicht nicht ohne weiteres erlauben, so daß es fraglich ist, ob in jenen Versuchen tatsächlich die notwendige Gerbung der inneren Zellulosewände zustande gekommen ist.

Im Prinzip bestätigt die hier entwickelte Vorstellung die Auffassung von Gassner (z. B. 1915b), der die Lichtwirkung als die „Hemmung einer Hemmung" gedeutet hat. Allerdings entwickelt sich diese Hemmung nicht aus dem Stoffwechsel des Embryos. Daß dieser keine wesentliche Rolle für die Lichtwirkung spielen kann, geht unter anderem aus unseren „Kälteversuchen" hervor, in denen der volle Lichteffekt bei Temperaturen erreicht wurde, bei denen mit einem merklichen Stoffumsatz des lebenden Teils der Samen nicht zu rechnen ist. Die sich entwickelnde Hemmung ist vielmehr schon in der Samenschale vorgebildet und besteht in einer oxydativen Entwertung der für die gerbende Wirkung auf die Sperrschicht bestimmten Polyphenole. Hier greift das Licht ein, indem es durch Reduktion die Polyphenole erhält oder sie regeneriert. Diese Lichtreaktion ist proportional der Lichtmenge. Dazu

löst das Licht die Polymerisation der einfachen Polyphenolmoleküle zu gerbenden Komplexen aus, und diese 2. Funktion, die in einer Lichtinduktion besteht, wird durch sehr geringe Lichtmengen ausgeübt, sofern die geeigneten Phenole vorhanden sind. Die im Dunkeln fortschreitende schließlich irreversible oxydative Entwertung der Gerbstoffvorstufen führt zur „Dunkelhärte". Wenn auch das Licht in diesem Falle aus Mangel an dem zu aktivierenden Substrat die Sperrschicht nicht mehr durchbrechen kann, so muß es möglich sein, dunkelharte Samen durch mechanische Eingriffe noch zum Keimen zu bringen, sofern die Embryonen bei dem ausgedehnten Dunkelaufenthalt, den sie bei mangelnder Sauerstoffversorgung überdauern mußten, nicht abgestorben sind.

Da wir uns von vornherein auf die samenschalengehemmten Typen von Lichtkeimern beschränkt haben, können wir natürlich auch bestätigen, daß die Lichtwirkung an der Testa ansetzt, worauf Gassner immer wieder hingewiesen hat. Wir sehen allerdings, daß bei anderen Typen eine Lichtwirkung auf den inneren Teil des Samens im Spiele ist, für die der Mechanismus ganz oder teilweise ein anderer sein kann, obwohl wir wegen des nachgewiesenen Vorkommens von Polyphenolen mindestens in den Kotyledonen von verschiedenen Samen (s. oben) ihre Mitwirkung beim Lichteffekt auf den Embryo nicht für unmöglich halten.

Daß viele Samen im Laufe der Lagerung unabhängiger vom Licht bei der Keimung werden, dürfte auf einer langsamen Bildung der Gerbstoffe in der lufttrockenen Samenschale beruhen. Umsetzungen der Polyphenole während der Samenlagerung machen sich im Nachdunkeln der Samen bemerkbar. Die verschieden starke Lichtempfindlichkeit, überhaupt das vom Jahrgang der Ernte, von den Wachstumsbedingungen usw. abhängige Keimverhalten (vgl. z. B. Wieser) wird, soweit es sich um den hier betrachteten Typ von Samen handelt, durch die Menge (und Art?) der in den Samenschalen abgelagerten Polyphenole, also indirekt vom Stoffwechsel während der Samenentwicklung und -reifung bestimmt, der seinerseits von Boden- und Klimabedingungen abhängig ist. Aus der Ernte 1952 stehen 2 Samenproben von *Lythrum salicaria* zur Verfügung, die zwar unter den gleichen klimatischen Bedingungen im Botanischen Garten Tübingen ausgebildet wurden, deren Mutterpflanzen aber einerseits auf trockenem und andererseits auf feuchtem Grund standen. Die Samen der trocken gewachsenen Pflanzen entwickeln alsbald nach dem Auslegen auf $FeCl_3$-Lösungen wie in den oben beschriebenen Versuchen auffallend weite und intensiv blau-violett gefärbte Höfe, die bei den trocken gewachsenen Samen viel unscheinbarer sind. Offensichtlich unterscheiden sich die beiden Proben durch die Menge der an das Keimbett abgegebenen eisenbläuenden Substanzen. Keimzahl und Keimgeschwindigkeit der trocken gewachsenen Samen

sind viel niedriger als bei den Samen vom feuchten Standort, und auch die Wirkung verschiedener Konzentrationen von $FeCl_3$ ist bei den beiden Herkünften deutlich verschieden. Die trocken gewachsenen Samen keimen zudem auch zu 8% im Dunkeln, während die Samen der feucht gehaltenen Pflanzen nur etwa 1% Dunkelkeimer aufweisen. Die genaue Auswertung der Unterschiede dieser Samen von verschiedenen Standorten soll aber erst später nach weiteren Versuchen erfolgen.

Auch die Wechselwirkungen zwischen dem Stoffwechsel von Testa und Embryo, die sicher bestehen, wirken sich auf die Lichtbedürftigkeit bei der späteren Keimung über die chemische Ausstattung der Samenschale aus. Von hier aus dürften sich einige Widersprüche lösen, die sich bei der Auswertung von Versuchen über die Vererbung der Lichtkeimung ergeben haben. Wenn auch die Testa rein mütterlicher Herkunft ist, so wird ihr Stoffwechsel wenigstens im Ausmaß, wenn nicht auch qualitativ von den Umsetzungen des Embryos beeinträchtigt. Eine lichtbedürftige Rasse von *Arabidopsis thaliana* (offenbar samenschalengehemmt, 60—80% Dunkelkeimung nach Verletzen der Samenschale) gibt als weiblicher Elter mit einer lichtindifferenten Rasse gekreuzt keine obligaten Lichtkeimer, aber die Keimzahl im Dunkeln war bei diesen Bastarden stets deutlich niedriger als bei den reziproken Kreuzungen, und bei einer bestimmten Kreuzung keimten die Samen im Dunkeln überhaupt nicht (KUGLER).

Bei *Nicotiana*-Samen war schon aus anderen Beobachtungen zu entnehmen, daß die Lichtwirkung nicht nur an der Samenschale, sondern auch am Embryo ansetzt. Die Kreuzungsversuche ergeben, daß die Testa nicht für die Lichtwirkung verantwortlich sein kann (HONING). Bei dem lichtbedürftigen *Nasturtium microphyllum* erweist sich Anstechen der Samenschale als unwirksam für die Dunkelkeimung, dementsprechend ergaben die Kreuzungsversuche, daß der Angriffspunkt des Lichtes im Embryo gesucht werden muß (HOWARD und LYON).

Versuche über die Wirkung verschiedener Spektralbezirke konnten wir über die oben genannten primitiven Orientierungen hinaus nicht anstellen. Es erscheint angesichts der gefärbten und dabei höchstwahrscheinlich meist indifferenten Substanzen in den Samenschalen auch wenig aussichtsvoll, aus einem Wirkungsspektrum etwas über die entscheidenden Substanzen aussagen zu können. Die Pigmente können als Sensibilisatoren für den wirksamen Stoff dienen, sie können aber auch die Absorption der betroffenen Verbindung verschleiern. MEISCHKE schließt aus seinen extensiven Untersuchungen deshalb nur auf fördernde und hemmende Wellenlängenbezirke. Leider ist ein Objekt, das von amerikanischen Forschern für solche Untersuchungen herangezogen wird, nämlich die Achaenen von *Lactuca sativa* (FLINT und MCALLISTER, BORTHWICK u. a.), insofern anomal, als es in der Fruchtwand Chlorophyll

enthält (vgl. Resühr), das in lichtgeförderten Samen noch nicht nachgewiesen wurde und in der Samenschale auch sehr unwahrscheinlich ist. Da Chlorophyll auch in ausgetrockneten und wieder angefeuchteten Zellen seine photochemische Reaktionsfähigkeit behält, ist nach der Belichtung von *Lactuca*-Früchten mit der Bildung aktiven Wasserstoffs zu rechnen, der dann in das für die Keimungsauslösung wirksame System eingreift. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß ein Optimum der Keimungsförderung beim Absorptionsmaximum des Chlorophylls auftritt, während das vom Chlorophyll nicht absorbierte längerwellige Rot (700—800 mμ) wie Dunkelheit hemmend wirkt. Die Vorstellung einer reversiblen Photoreaktion bei der Lichtkeimung fügt sich unserem Bild in Form der Reaktion (a) im Schema S. 553 ein. Auch Einzelheiten der Beobachtungen an dem wegen des Chlorophyllgehaltes nicht typischen Objekt lassen sich unserer Vorstellung zwanglos einordnen, z. B. die größere Lichtmenge, die nach längerer Vorquellung zur Erzielung gleicher Keimprozente erforderlich ist (das Gleichgewicht von a wird im Dunkeln fortlaufend nach rechts verschoben) und die schwindende Möglichkeit, durch langwelliges Rot zu hemmen, wenn die Lichtwirkung einige Stunden gedauert hat (der Vorgang b unseres Schemas hat den gerbenden Komplex bereits zustande gebracht).

Auch die auf den ersten Blick paradox erscheinende Tatsache, „daß die Lichtkeimung der Samen von *Digitalis purpurea* verschlechtert wird, einerseits, wenn ihnen durch Auswaschen bestimmte Stoffe entzogen, andererseits aber auch, wenn dieselben Stoffe in Form von Extrakten hinzugefügt werden", sprengt die hier gegebene Deutung nicht sondern unterstützt sie. Die hemmende Wirkung der Samenextrakte „erstreckt sich gar nicht auf die vom Licht abhängigen inneren Vorgänge während der Samenkeimung, sondern sie beschränkt sich auf Störungen der Wurzelentwicklung, und zwar bei und nach dem Hervortreten der Keimwurzel" (Grohne). Diese Keimungshemmung hat also mit der Lichtkeimung gar nichts zu tun. Das Wachstum der Keimwurzel meist erst nach Durchbrechen der Testa ist gehemmt. Darin besteht ja bei genauerer Betrachtung auch die Funktion der meisten sog. „Blastokoline", die in erster Linie nicht die Keimzahl sondern die Wurzellänge beeinträchtigen (vgl. Paech 1949). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch die Wirkung bestimmter Konzentrationen von $FeCl_3$ (z. B. 10^{-3} g/cm^3), die zwar die Keimzahl bzw. Keimgeschwindigkeit erhöhen, aber nach Durchbruch der Radicula deren Wachstum stark hemmen und schädigen, so daß trotz rascherer Keimung sich auf diesen Konzentrationen höchstens verkrüppelte Keimlinge entwickeln. Auch das ist wiederum ein Zeichen dafür, daß der die Lichtwirkung modifizierende Eingriff der Eisensalze an der Samenschale und nicht am Embryo ansetzt.

Ganz anders als bei Zugabe der ausgelaugten Substanzen verhält es sich mit der starken Herabsetzung der Keimzahl durch das Auslaugen selbst. Dabei bleibt schon die Stärkebildung in der Keimwurzel von *Digitalis purpurea* aus als Zeichen dafür, daß die ersten Vorgänge der Lichtwirkung gar nicht abgelaufen sind. Das Auswaschen entfernt die Gerbstoffvorstufen rascher als sie durch Polymerisation zum aktiven Gerbstoff zusammengefügt werden können. Die entscheidende Lichtwirkung findet deshalb keinen Angriffspunkt. Gerade dieses Beispiel, für das GROHNE die Symptome so schön beschrieben hat, zeigt, daß nicht etwa ein Hemmstoff oder Hemmstoffsystem aus der Samenschale entfernt werden muß, sondern daß in ihr ein bestimmtes lösliches System erhalten werden muß, wenn das Licht seine keimungsauslösende Wirkung ausüben soll. Daß über die Komponenten dieses Polyphenolsystems und seine Umsetzungen im einzelnen noch nichts Genaueres ausgesagt werden kann, rührt hauptsächlich davon her, daß diese vielgestaltigen und zu mannigfachen spontanen, photochemischen und enzymatischen Umwandlungen bereiten Stoffe trotz ihrer universellen Verbreitung im Pflanzenreich biochemisch recht vernachlässigt worden sind und rein chemisch nur insoweit Interesse gefunden haben, als sie technisch von Bedeutung erschienen. Wir glauben am Beispiel der samenschalengehemmten Lichtkeimer gezeigt zu haben, welche wichtigen biologischen Funktionen gewisse Gruppen der Polyphenole auch nach dem Tode der sie produzierenden Zellen übernehmen können. Sie stehen auch darin in einer bemerkenswerten Parallele zur Bildung und Funktion des Lignins, zu dem, wie oben erwähnt, die engsten chemischen Beziehungen bestehen.

Eine Vorstellung vom Mechanismus der Lichtkeimung wäre nicht viel wert, wenn sie nicht die Möglichkeit der Erweiterung auf Dunkelkeimer böte; denn im Prinzip scheinen beide lichtempfindlichen Samentypen übereinzustimmen. Sogar die gleiche Samensorte soll unter verschiedenen Außenbedingungen oder in verschiedenen Reifezuständen lichtbedürftig oder lichtgehemmt sein. Ehe jedoch nicht einwandfrei geklärt ist, ob es unter den Dunkelkeimern auch Typen gibt, deren Lichtempfindlichkeit allein in der Samenschale lokalisiert ist, und ehe nicht ein Beispiel für diesen Typ in ähnlich umfassender Weise wie *Lythrum* auf die Abhängigkeit von anderen Faktoren untersucht worden ist, erscheint es müßig, eine genauere Vorstellung von der hemmenden Lichtwirkung zu entwickeln. Entscheidend scheint auch dabei eine lichtbedingte Reduktion zu sein, denn durch erhöhte Sauerstoffkonzentration können bestimmte Dunkelkeimer auch im Licht zum Keimen gebracht werden. Der wesentliche Unterschied liegt dann wohl darin, daß bei Dunkelkeimern die oxydative Polymerisation auch ohne Licht schneller verläuft als die entwertende Oxydation zu Phlobaphenen oder ähnlichen Komplexen. Die reduzierende Wirkung des Lichtes übertrifft

bei Dunkelkeimern die der oxydativen Polymerisation. Der Unterschied zwischen Licht- und Dunkelkeimern ist also nur graduell und besteht in erster Linie in den Geschwindigkeitsverhältnissen der an den Polyphenolen ansetzenden oxydoreduktiven und polymerisierenden Vorgänge.

Zusammenfassung.

1. Viele Beobachtungen sprechen dafür, daß die Keimung bestimmter Samen durch ein in der Samenschale lokalisiertes Hindernis gehemmt wird, das dem Zutritt von Sauerstoff zum Embryo im Wege steht. Zu diesem Typ der samenschalengehemmten Samen gehören auch verschiedene Lichtkeimer, unter anderen *Lythrum salicaria*. Das Licht beseitigt diese Barriere und vervollständigt damit die Voraussetzungen für die Keimung.

2. Eine genauere Charakteristik der benutzten Rasse von *Lythrum salicaria*-Samen erweist sie als stark lichtbedürftig und als sehr unempfindlich in verschiedener Hinsicht (z. B. bei der Vorquellung und bei Temperaturschwankungen). Es lassen sich keine Anhaltspunkte dafür finden, daß das Licht die Quellungsgeschwindigkeit und den Quellungsgrad der zur Keimung ausgelegten Samen beeinflußt.

3. Eisenchlorid und andere Eisensalze in Konzentrationen von 10^{-2} bis 10^{-9} g/cm³ zum Keimungsmedium gegeben wirken bei fallender Konzentration abwechselnd relativ fördernd und hemmend auf die Keimgeschwindigkeit sowohl bei *Lythrum* als auch bei *Digitalis purpurea*. Dunkelkeimung konnte mit diesem Mittel jedoch nicht ausgelöst werden. Nur durch drastische Eingriffe wie Anritzen der Samenschale, Behandlung mit konzentrierter Salzsäure oder Aceton u. ä. wurde ein gewisser Prozentsatz der Samen zur Keimung ohne Licht veranlaßt.

4. Belichtung im sauerstoffarmen Raum löst keine Keimung aus. Die Messung der Atmungsintensität der bei Sauerstoffmangel belichteten Samen nach Überführen in normale Atmosphäre bestätigt, daß Licht ohne Sauerstoff die für die Keimung entscheidende Veränderung am Samen nicht zustande bringen kann.

5. Bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Versuche und der in der Literatur bereits vorliegenden Daten über Lichtkeimung wird auf die in den Samenschalen der Lichtkeimer vorhandenen Polyphenole als Gerbstoffvorstufen aufgebaut. Die lichtbedürftige Vorbereitung der Keimung bei den samenschalengehemmten Typen der Lichtkeimer besteht demnach in folgendem. In der Samenschale befinden sich eine oder mehrere Zellschichten, deren Zellwände wegen zu starker Hydratisierung der Zellulose dem Sauerstoffzutritt zum Embryo eine Barriere in den Weg stellen. Die Testa enthält dazu Polyphenole, die entweder durch Oxydation zu unwirksamen Komplexen (Phlobaphenen) oder durch lichtinduzierte Polymerisation zu aktiven Gerbstoffen umgewandelt

werden, die ihrerseits die Zellwände der „Sperrschicht" gerbend so verändern, daß diese die Sauerstoffdiffusion zum lebenden Teil des Samens zulassen. Das Licht wirkt dabei einerseits reduzierend und erhält damit die polymerisierbaren Polyphenole oder es regeneriert sie, soweit sie reversibel oxydiert waren. Andererseits induziert oder beschleunigt das Licht die Polymerisation der Polyphenole. Es gibt damit diesem zu den aktiven Gerbstoffen führenden Vorgang das Übergewicht gegenüber der im Dunkeln vorherrschenden Oxydation, die zu den für die Keimungsauslösung unwirksamen Phlobaphenen oder ähnlichen oxydierten Komplexen führt. Die Polymerisation schließt aber auch einen oxydativen Schritt ein. Im Prinzip können sich die gleichen Vorgänge auch bei samenschalengehemmten Dunkelkeimern abspielen, bei denen nur die Geschwindigkeitsverhältnisse verschoben zu sein brauchen, um im Licht die Reduktion gegenüber der notwendigen Polymerisation überwiegen zu lassen und damit die Keimung zu verhindern. Für den anderen Typ von Lichtkeimern, bei dem das Licht auf den Embryo wirken muß, steht die Klärung des Mechanismus noch aus.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für Sachbeihilfen zu diesen Untersuchungen.

Literatur.

Axentjew, B. N.: Beih. bot. Cbl. I **46**, 119 (1930). — Barton, L. V.: Contrib. Boyce Thompson Inst. **16**, 387 (1951). — Batzer, H., u. G. Weissenberger: Makromolekulare Chem. **7**, 321 (1951). — Bergmann, M., u. G. Pojarlieff: Naturwiss. **18**, 1114 (1930). — Bihlmeier, M.: Jb. wiss. Bot. **67**, 702 (1928). — Böhmer, K.: Jb. wiss. Bot. **68**, 549 (1928). — Borthwick, H. A. u. a.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **38**, 662 (1952). — Brass, K., u. O. Gronych: Kolloid-Z. **78**, 51 (1937). — Brauner, L.: Jb. wiss. Bot. **73**, 513 (1930). — Brieskorn, C. H.: Pharmazie **2**, 489 (1947). — Brown, R.: Ann. of Bot., N. S. **4**, 379 (1940). — Buston, M : Brit. J. Radiol. **24**, 416 (1951). — Busse, W.: Z. Bot. **18**, 65 (1925). — Cavazza, L.: Ber. schweiz. bot. Ges. **60**, 596 (1950). — Crocker, W.: Growth of Plants. New York 1948. — Evans, M. G., and N. Uri: Symposia Soc. f. Exper. Biol. **5**, 130 (1951). — Flint, L. H., and E. D. McAllister: Smithsonian Miscellaneous Collections **96**, No 2 (1937). — Franke, W.: Liebigs Ann. **480**, 1 (1930). — Freudenberg, K.: Chemie der natürlichen Gerbstoffe. Berlin 1920. — Tannine, Cellulose, Lignin. Berlin 1933. — Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl. **1949**, 5. Abh. — Freudenberg, K., u. Mitarb.: Chem. Ber. **85**, 641 (1952). — Frietinger, G.: Flora (Jena) **122**, 167 (1927). — Gassner, G.: Ber. dtsch. bot. Ges. **29**, 708 (1911). — Jb. wiss. Bot. **55**, 259 (1915a). — Z. Bot. **7**, 609 (1915b); **23**, 767 (1930). — Grohne, U.: Biol. Zbl. **71**, 10 (1952). — Härtel, O.: Protoplasma (Berl.) **40**, 338 (1951). — Herrmann, K.: Pharmazie **7**, 431 (1952). — Hesse, O.: Ber. dtsch. bot. Ges. **41**, 316 (1923). — Bot. Archiv **5**, 133 (1923). — Hodgson, H. J.: Agronomy J. **41**, 531 (1949). — Honing, J. A.: Genetica ('s-Gravenhage) **12**, 441 (1930). — Howard, H. W., and A. G. Lyon: Nature (Lond.) **168**, 253 (1951). — Johnson, G. u. a.: Food Res. **16**, 169 (1951). — Karrer, P.: Lehrbuch der organischen Chemie, 10. Aufl. Stuttgart 1948. — Kinzel, W.: Ber. dtsch. bot. Ges. **25**, 269 (1907). — Kipp, M.: Jb. wiss. Bot. **71**, 533 (1929). —

Kugler, I.: Beitr. Biol. Pflanz. **28**, 211 (1951). — Lauer, K.: Kolloid Z. **121**, 36 (1951). — Lehmann, E., u. F. Aichle: Keimungsphysiologie der Gräser. Stuttgart 1931. — Lehmann, E., u. A. Ottenwälder: Z. Bot. **5**, 337 (1913). — Masquelier, J.: Recherches sur les pigments de la graine d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). Diss. Bordeaux 1948. Ref.: Ber. Biol. **65**, 277 (1949). — Miličic, D., u. L. Brat: Phyton (Horn, N.-Oe.) **4**, 221 (1952). — Molisch, H.: Ber. dtsch. bot. Ges. **34**, 69 (1916). — Netolitzky, F.: Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. X, Teil II/2. — Neuberg, C.: Biochem. Z. **29**, 279 (1910); **39**, 158 (1912). — Niethammer, A.: Jb. wiss. Bot. **66**, 285 (1927). — Paech, K.: Z. Naturforschg. **4** b, 46 (1949). — Biochemie und Physiologie sekundärer Pflanzenstoffe. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1950. — Paech, K., u. F. Eberhardt: Z. Naturforschg. **7** b, 664 (1952). — Petrucci, D.: Atti Accad. naz. Lincei VIII. s. 8, 382 (1950). — Pincussen, L.: Photobiologie. Leipzig: Georg Thieme 1930. — Reinitzer, F.: Ber. dtsch. bot. Ges. **7**, 187 (1889). — Resühr, B.: Ber. dtsch. bot. Ges. **57**, 315 (1939a). — Planta (Berl.) **30**, 471 (1939b). — Russell, A.: Chem. Rev. **17**, 155 (1935). — Schröppel, F.: Beih. bot. Cbl. I. **51**, 377 (1933). — Siegel, S. M.: Bot. Gaz. **112**, 57 (1951). — Stålfelt, M. G.: Biol. Zbl. **46**, 11 (1926). — Stone, E. C., and G. Juhren: Amer. J. Bot. **38**, 368 (1951). — Tamiya, H. u. a.: Acta phytochim. (Tokyo) **5**, 119 (1931). — Tilly, F.: Z. Bot. **28**, 401 (1935). — Weiland, E.: Biochem. Z. **317**, 168 (1944). — Weiss, J.: Symposia Soc. f. Exper. Biol. **5**, 141 (1951). — Wels, P.: Forschgn. u. Fortschr. **26**, 309 (1950). — Went, F. W.: Ecology **29**, 242 (1948). Zit. Fortschr. Bot. **12**, 134 (1949). — Wieland, H., u. W. Franke: Liebigs Ann. **464**, 101 (1928). — Wieser, G.: Planta (Berl.) **4**, 526 (1927). — Wiesner, J., u. H. Molisch: Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturwiss. Kl., Abt. I **98**, 670 (1890). — Zaprametov, M. N.: Biochimija **15**, 137 (1950). Ref:. Ber. Biol. **76**, 299 (1952).

Prof. Dr. K. Paech, Tübingen, Wilhelmstraße 5.

Planta, Bd. 41, S. 567—588 (1953).

Aus dem Biologischen Laboratorium der Österreichischen Stickstoffwerke A.G. in Linz a. D. (Leiter: Privatdozent Dr. H. Linser).

KOLORIMETRISCHE UND BIOLOGISCHE BESTIMMUNG SOWIE CHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON WUCHSSTOFFEN AUS PFLANZEN.

Von

Hans Linser und Fridolin Maschek.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 5. Dezember 1952.)

In einer früheren Mitteilung (Linser 1951) wurde über Versuche zur chromatographischen Trennung der in Pflanzenextrakten vorliegenden Wuchs- und Hemmstoffe berichtet, welche zeigten, daß es durch Anwendung chromatographischer Methoden tatsächlich gelingt, verschiedene Fraktionen aus Pflanzenextrakten mit Wuchsstoffwirkung neben solchen mit Hemmstoffwirkung getrennt zu erhalten. Inzwischen gelang es auch L. C. Luckwill (1952), und zwar an wäßrigen und ätherischen Extrakten aus Apfelendosperm bei Anwendung papierchromatographischer Methodik, welche bereits von Bein, Signer und Schopfer (1947) zum Nachweis von Indol-3-essigsäure in Penicillinpräparaten benützt worden war, Wuchsstoff- und Hemmstoffanteile zu trennen, wobei allerdings die zum biologischen Test verwendete Koleoptilzylindermethode nur bei sehr wuchsstoffarmen Pflanzen in der verwendeten, vereinfachten Form kritikfeste Ergebnisse liefern kann. Auf, bauend auf den Ergebnissen von Linser kombinierten Denffer-Behrens und Fischer (1952) die Säulenchromatographie mit Papierchromatographie und einer Papierelektrophoresemethode. Sie konnten zeigen, daß der an der Aluminiumoxydsäule adsorbierte Anteil der Extrakte aus Rosenkohl, welcher die Indolkörperreaktion mit Natriumnitrit-Salzsäure (Rotfärbung) gibt, nur zu einem geringen Teil auf die Anwesenheit pflanzeneigener Indol-3-essigsäure zurückzuführen ist und daß neben dieser noch ein (vielleicht ein Gemisch), ebenfalls die Indolreaktion zeigender Körper vorhanden ist, der im Kressewurzeltest als Wuchsstoff reagiert. Nun ermöglicht leider der Kressewurzeltest mangels hinreichender Genauigkeit im streckungsfördernden Bereich keine befriedigende Unterscheidung von Wuchs- und Hemmstoffen, weshalb diese Methode für Untersuchungen, bei welchen es auf diese Unterscheidung besonders ankommt, unzweckmäßig ist. Aus diesem Grunde, und weil keine, für kleinste Mengen geeignete, chemische Methode zur

quantitativen Bestimmung der Indol-3-essigsäure bzw. des Indol-3-acetaldehyds zur Verfügung stand, mußten die quantitativen Wuchsstoffbestimmungen allein mit Hilfe des physiologischen Pastentestes (vgl. LINSER 1938) durchgeführt werden. Dieser gestattet jedoch keine einfache Unterscheidung zwischen heteroauxinartigen Wuchsstoffen und solchen andersartigen Charakters und es war daher wünschenswert, eine quantitative chemische Bestimmungsmethode für die bekannten pflanzeneigenen Heteroauxine [Indol-3-essigsäure, Indol-3-acetaldhyd und nach DENFFER, BEHRENS und FISCHER (1952b) auch Inodolacetonitril] zu finden, welche eine Bestimmung des Heteroauxinanteiles an der Gesamtwuchsstoffwirkung ermöglichen konnte. Methoden zur kolorimetrischen Bestimmung von Indol-3-essigsäure sind unter anderen von J. W. MITCHELL und W. G. BRUNSTETTER (1939) und von S. A. GORDON und R. P. WEBER (1951) beschrieben worden. Die ältere der beiden genannten Methoden benützt die beim Versetzen von Indol-3-essigsäure mit einer Lösung von Natriumnitrit in eine Mineralsäure entstehende Rotfärbung als Grundlage.

Bei einer von E. MÜLLNER in unserem Laboratorium durchgeführten Untersuchung ergab sich jedoch, daß die Intensität der Rotfärbung, welche durch Vermischen einer 0,5%igen wäßrigen Lösung von Natriumnitrit, konzentrierter Salzsäure und einer 0,01%igen Lösung von Indol-3-essigsäure in Alkohol entsteht, je nach der Art des Vermischens großen Schwankungen unterworfen ist. Wurde die alkoholische Lösung von Indol-3-essigsäure mit einer kleinen Menge einer Mischung von 5 cm³ 0,5% wäßriger Lösung von Natriumnitrit und 50 cm³ konzentrierter Salzsäure möglichst schnell vermischt, so ergab sich zwar eine zeitliche Konstanz des Farbtones in der Zeit von 15—60 min nach dem Mischen, doch war die Reproduzierbarkeit der Farbintensität unzureichend. Bei gleichzeitigem Einfließenlassen unter heftigem Rühren von 5 cm³ 0,01% Indol-3-essigsäure (alkoholisch) und 5 cm³ HCl-$NaNO_2$-Lösung (s. oben) in ein Mikrorührgefäß während 10 min wurden bei Messungen, welche 10 min nach Abschluß des Rührvorganges durchgeführt wurden, höhere Farbintensitäten und etwas größere Empfindlichkeit der Reaktion erzielt. Wurde das Reagens vorgelegt und die Indol-3-essigsäure-Lösung unter Rühren zufließen gelassen, so war die Empfindlichkeit der Reaktion fast 10fach so groß, wie umgekehrt bei Vorlage der Untersuchungslösung und Zufließenlassen des Reagens. In beiden Fällen blieb die Reproduzierbarkeit der Farbintensität bei gleichen Mengenverhältnissen jedoch unbefriedigend. Es wurden daher Versuche durchgeführt, bei welchen 5 cm³ Indol-3-essigsäure-Lösung mit 0,5 cm³ einer 0,5%igen wäßrigen Natriumnitritlösung versetzt und dann unter Rühren im Mikrorührkolben mit 4,5 cm³ konzentrierter Salzsäure versetzt wurden. Auch hier zeigte sich die größere Empfindlichkeit der Reaktion dann, wenn nicht die Untersuchungslösung mit $NaNO_2$, sondern die Salzsäure vorgelegt wurde.

Schließlich ergab folgende Arbeitsweise befriedigende Ergebnisse: 5 cm³ konzentrierter Salzsäure wurden im Rührgefäß vorgelegt. Dann wurden am Rührer entlangfließend tropfenweise während 7 min 5 cm³ einer Mischung von 10 cm³ alkoholischer Untersuchungslösung (I-3-E) mit 1 cm³ 0,5%iger wäßriger Lösung von Natriumnitrit zugesetzt. Die kleinste, bei 10 mm Schichtdicke noch meßbare Menge betrug 2,5 mg-%.

Es zeigte sich jedoch in weiteren Untersuchungen, daß noch größere Empfindlichkeit bzw. noch besser reproduzierbare Werte mit der Methode von GORDON und WEBER erhalten wurden. Die genannten Autoren benutzten als Reagens ein Gemisch aus 50 cm³ 35%iger[1] Perchlorsäure ($HClO_4$) + 1 cm³ 0,5 m$FeCl_3$. Der zu untersuchenden, Indol-3-essigsäure in 96%igem Alkohol gelöst enthaltenden Probe wurde $^1/_2$ Volumteil der eben erwähnten Reagenslösung zugefügt. Nach 25—30 min Wartezeit wurde bei 530 mμ der Extinktionswert (im Pulfrich-Photometer) bestimmt. Bei Verwendung von Küvetten von 10 mm Schichtdicke wurden dabei mit der Konzentration der Indol-3-essigsäure bis zu 60 γ/cm³ (6 mg-%) linear ansteigende Extinktionswerte gefunden. Bei 50 γ/cm³ ergab sich eine Extinktion von 1,02. Der Meßbereich der Methode umfaßt (bei 10 mm Schicht) etwa 1—60 γ/cm³ Indol-3-essigsäure. Ihre Empfindlichkeit liegt somit wesentlich höher als jene der Nitrit-Mineralsäurereaktion, so daß sie sich dieser in jeder Hinsicht überlegen erwies und daher für alle in der vorliegenden Arbeit erwähnten kolorimetrischen Bestimmungen der Indol-3-essigsäure in Pflanzenmaterial bzw. Extrakten herangezogen wurde.

Einige Vorsicht bei der Handhabung der Methode ist insofern geboten, als die im Verlauf der Reaktion gebildete Rotfärbung nur im Dunkeln stabil ist bzw. farbkonstant erhalten bleibt. Daß man vor allem nicht im direkten Sonnenlicht arbeiten soll, zeigt ein Versuch mit 25 γ Indol-3-essigsäure/cm³, bei welchem die Proben nach der Durchführung der Reaktion verschiedene Zeiträume hindurch verschiedenen Lichtverhältnissen ausgesetzt waren (Tabelle 1).

Tabelle 1. *Extinktionswerte (530 mμ) von 25 γ/cm³ Indol-3-essigsäure zu verschiedenen Zeiten nach der Perchlorsäurereaktion bei verschiedenen Belichtungsverhältnissen.*

Zeit in Minuten	Sonnenlicht	Raum mit diffusem Tageslicht	Raum mit schwacher künstlicher Belichtung	Raum mit rotem Licht	Dunkelraum
30	0,220	0,467	0,496	0,500	0,496
60	0,172	0,471	0,491	0,491	0,495
90	0,150	0,464	0,500	0,499	0,499
180	0,059	0,495	0,495	0,492	0,500
210	0,042	0,448	0,492	0,500	0,491

[1] Die Genauigkeit bei der Bestimmung des Prozentgehaltes der Perchlorsäure ist für die erhaltene Farbintensität von ausschlaggebender Bedeutung. Während mit 35%iger Perchlorsäure (beim Arbeiten im Dunkeln) für 50 γ I-3-E eine Extinktion (530 mμ) von 0,998 erhalten wurde, ergab 30%ige Perchlorsäure eine solche von nur 0,745, 40%ige jedoch eine solche von 1,115. Von ebensolcher Wichtigkeit ist eine genaue Einhaltung des Eisenchloridgehaltes, welcher für alle mit einer bestimmten Eichkurve vergleichbar sein sollenden Bestimmungen konstant gehalten werden muß.

Die Reaktion ist für Indol-3-essigsäure nicht spezifisch. GORDON und WEBER geben eine Übersicht über die Spezifität verschiedener Farbreaktionen für Indolkörper (Tabelle 2), der zu entnehmen ist, daß Tryptophan die Bestimmung nicht stört, ebensowenig Indol-3-propionsäure; dagegen geben Indol selbst, ebenso wie Skatol und Indol-3-buttersäure die Farbreaktion in starkem Ausmaß.

Tabelle 2. *Die Spezifität verschiedener Farbreaktionen für verschiedene Indolderivate in äquimolekularen Mengen (0,125 Millimol) nach* S. A. GORDON *und* R. P. WEBER *(1951). (Absorptionsprozente).*

	Farbreaktion				
	$Fe/HClO_4$	Fe/H_2SO_4	$Co/HClO_4$	$Hg/HClO_4$	KNO_2HNO_3
Indol	9,86	20,6	16,9	25,0	3250
Skatol	10,9	26,0	40,8	25,0	24,2
Indol-3-aldehyd	0,86	3,65	23,1	8,35	1,96
Indol-3-carbonsäure	4,03	9,90	27,0	16,6	10,4
Indol-3-propionsäure	0,00	0,52	0,96	6,25	8,50
Indol-3-buttersäure	11,9	26,9	28,9	2,85	11,1
Tryptophan	0,00	0,42	1,91	4,17	5,88

Die Extraktion der Wuchsstoffe aus dem Pflanzenmaterial sowie die weitere Aufarbeitung der Extrakte geschah auf folgende Weise: Die gewogene Menge an frischem Pflanzenmaterial wurde mit einem Messer zerschnitten und in einer Achat-Reibschale mit einer 3fachen Gewichtsmenge 96%igem heißem Äthylalkohol übergossen, zerquetscht bzw. unter Alkohol zerrieben und anschließend 24 Std lang im Soxhletapparat extrahiert (vgl. LINSER 1939). An einer Probe des gleichen, frischen Pflanzenmaterials wurde parallel dazu das Trockengewicht bestimmt. Der aus dem Soxhlet gewonnene, alkoholische, wasserhaltige Extrakt wurde auf einem Wasserbad auf 50 cm^3 Volumen eingeengt und an Aluminiumoxyd (BROCKMANN) chromatographiert[1]. Die Chromatogramme wurden an 22 cm hohen Säulen von 20 mm Durchmesser erhalten, welche nach dem Einfüllen mit 50 cm^3 96%igem Alkohol vorgewaschen waren. Das Einfüllen des Pflanzenextraktes geschah unmittelbar anschließend an das Absaugen des zum Vorwaschen benützten Alkohols. Um das Einfüllen der Lösungen zu erleichtern, war das obere Ende der Säule durch eine dünne Auflage von Glaswolle geschützt.

Nach dem Durchsaugen der Flüssigkeit durch die Säule wurde mit 50 cm^3 reinem 96%igem Alkohol nachgewaschen (bzw. entwickelt).

Die Aluminiumoxydsäule wurde nach den bei Betrachtung im ultravioletten Licht sichtbar werdenden Fluoreszenzfarben in verschieden

[1] Von der Möglichkeit der Papierchromatographie (JERCHEL und MÜLLER 1951) wurde Abstand genommen, da zum physiologischen Test vorerst noch größere Mengen an Wuchsstoffen erforderlich sind.

lange Abschnitte geteilt, über deren Ausmaß in den Tabellen der Versuchsergebnisse (Tabelle 4—13) Angaben vorliegen. Die einzelnen, voneinander abgetrennten Schichten wurden mit n/2 NaOH eluiert, die Eluate anschließend mit n/2 HCl neutralisiert und durch Zentrifugieren von ausgeflocktem $Al(OH)_3$ gereinigt. Dann wurden die Eluate am Wasserbad zur Trockne eingedampft. Die Rückstände wurden mit einem Glasstempel pulverisiert, nochmals mit 96%igem Alkohol extrahiert und in Meßkölbchen auf 25 cm³ gebracht. 12,5 cm³ davon wurden am Wasserbad zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 2 g Lanolinpaste aufgenommen und nach der Pastenmethode (LINSER 1938) getestet. Die anderen 12,5 cm³ wurden ebenfalls im Wasserbad eingedampft, der Rückstand mit 5 cm³ 96%igem Alkohol aufgenommen und 1,5 cm³ davon mit 3 cm³ einer Mischung aus 50 Volumteilen 35%iger Perchlorsäure mit einem Volumteil 0,5 m Ferrichlorid versetzt. Nach einer Wartezeit von 30 min wurde die entstandene Rotfärbung im Stufenphotometer gemessen und an einer Indol-3-essigsäure-Eichkurve der Indol-3-essigsäure-Äquivalentwert der Farbreaktion abgelesen.

Das Filtrat aus dem Chromatogramm wurde auf dem Wasserbad auf 50 cm³ eingeengt. 25 cm³ davon wurden am Wasserbad zur Trockne gebracht, der Rückstand in 2 g Lanolinpaste aufgenommen und nach der Pastenmethode an der *Avena*-Koleoptile getestet. Die restlichen 25 cm³ wurden ebenfalls am Wasserbad eingedampft, der Rückstand in 5 cm³ 96%igem Alkohol aufgenommen und wie oben angegeben bei 530 mμ nach Durchführung der Perchlorsäurereaktion stufenphotometrisch gemessen. Der Extinktionswert wurde an Hand der Eichkurve ebenfalls in Indol-3-essigsäure-Äquivalente umgerechnet.

Die mittels der Pastenmethode gewonnenen Testergebnisse * wurden ebenfalls an einer mit reiner Indol-3-essigsäure erhaltenen Eichkurve (Tabelle 3) in Indol-3-essigsäure-Äquivalente transformiert. Hierbei leistete die neben den Zuwachswerten (Z%) erfolgende Beobachtung der

Tabelle 3. *Eichwerte der Indol-3-essigsäure-Eichkurve zur Bestimmung der Indol-3-essigsäure-Äquivalente aus den Z%-Testergebnissen. Mittelwerte aus 10 Versuchsreihen (422/558).*

	% Indol-3-essigsäure				
	10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Z%	+29,7	+55,8	+49,2	+13,5	+2,0
Krümmungsgrad	++	+	−−	− −	−
α^{0}	+240	− 55	− 103	− 106	− 16

Krümmungswerte (α^{0}) wertvolle Dienste bei der Bestimmung der größenordnungsmäßig richtigen Lage der Testwerte an der Eichkurve. Eine

* Die Durchführung dieser Versuche lag in Händen von Frau L. HALLER.

Schwierigkeit der Transformation von Testergebnissen von Pflanzenextrakten in Indol-3-essigsäure-Äquivalente besteht darin, daß die Konzentrationswirkungskurven bei Pflanzenextrakten stets etwas anders geformt sind als bei reiner Indol-3-essigsäure. Um eine möglichst gute Annäherung zu erzielen, wurde so vorgegangen, daß womöglich neben der unverdünnten Extraktpaste auch eine auf $^1/_{10}$ und eine auf $^1/_{100}$ (mit reinem Lanolin) verdünnte Extraktpaste zur Testung kam und aus den erhaltenen Werten der für die Konzentration 1 : 1 errechnete Mittelwert eingesetzt wurde. Das Wirkungsoptimum (für Z%) lag dabei in einigen Fällen von Pflanzenextrakten zahlenmäßig etwas höher als jenes der reinen Indol-3-essigsäure in der Eichkurve. In solchen Fällen wurden die Indol-3-essigsäure-Äquivalente anstatt aus der absoluten Größe von Z% aus der Lage des Wirkungsoptimums ermittelt. Sind so die Ergebnisse des physiologischen Testes mit einigem Vorbehalt zu betrachten, so ist seine Genauigkeit doch hinreichend, um größenordnungsmäßige Aussagen zu gestatten, wie sie in der vorliegenden Untersuchung als Ergebnis erhalten werden.

Zur vergleichenden biologischen und kolorimetrischen Wuchsstoffbestimmung in Chromatogramm und Filtrat wurden zunächst als außerordentlich wuchsstoffreich (LINSER 1939, 1940) bekannte Brassicaceen, nämlich Blumenkohl, Weißkraut und Wirsingkohl herangezogen und zum Vergleich dazu zwei als wuchsstoffarm zu bezeichnende Pflanzen, nämlich Tomate und Kren.

Die am Pflanzenmaterial der oberirdischen Organe von erwachsenen Blumenkohlpflanzen erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Sie zeigen, daß 36,5% der kolorimetrisch bestimmbaren Indol-3-essigsäure-Äquivalente die Säule durchlaufen und sich im Filtrat finden. Nach früheren Untersuchungen (LINSER, 1951) bleibt die Indol-3-essigsäure selbst jedoch quantitativ an der Säule adsorbiert, es sei denn, daß man mit zu großen Mengen von dieser Substanz arbeitet oder aber mit zu viel Alkohol entwickelt bzw. nachwäscht. In solchem Falle aber zeigt sich in den Abschnitten der Säule kein ausgesprochenes Maximum an I-3-E-Äquivalenten. Im vorliegenden Versuch aber (Tabelle 4) wurde im Abschnitt II der Chromatogrammsäule ein Wert von 56,0 γ (= 11,2 γ je cm), in Abschnitt III aber ein Maximum von 58,7 γ I-3-E-Äquivalenten gefunden, während in Abschnitt IV nur 15,8 γ (= 1,7 γ je cm), im Filtrat aber 81,0 γ vorlagen. Diese Zahlen zeigen, daß der in der Säule festgehaltene Anteil in I-3-E-Äquivalenten ein anderes Adsorptionsverhältnis aufweist als der im Filtrat vorliegende. Unter Berücksichtigung der an reiner Indol-3-essigsäure erhaltenen Ergebnisse ist der Schluß gerechtfertigt, daß es sich bei den in der Säule adsorbierten I-3-E-Äquivalenten tatsächlich um Indol-3-essigsäure handelt. Bei dem im Filtrat gefundenen I-3-E-Äquivalenten aber kann es

Tabelle 4. *Brassica oleracea var. botrytis (Blumenkohl); Durchschnittsmaterial der oberirdischen Teile. Verwendete Mengen an Pflanzenmaterial: 14,85 g Frischsubstanz = 1,91 g Trockensubstanz (= 12,9%).*

Kolorimetrische Methode						Pastenteste				Differenz		
Schicht	Länge des Säulenabschnittes in cm	Fluoreszenzfarben von oben nach unten	Extinktion	Indol-3-essigsäure-Äquivalente in dem Abschnitt	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz		Z %	Eichwert	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz	nicht wuchsstoffwirksame Indolkörper (in Äquivalenten)	nicht indolartige Wuchsstoffe (in Äquivalenten)	Bemerkung über die Beurteilung des kolorimetrischen wie auch des biologischen Testergebnisses
Chromatogramme I	2	grau gelb gelb	0,231	11,5	6,0	—	40,5	$6{,}2 \cdot 10^{-3}$	13	·	7,0	
Chromatogramme II	5	grau	1,12	56,0	29,3	+	57,2	$8{,}5 \cdot 10^{-2}$	178	·	148,7	
Chromatogramme III	6	blau	1,17	58,7	30,7	++	54,9	$1{,}1 \cdot 10^{-1}$	230	·	199,3	
Chromatogramme IV	9	rosa	0,312	15,6	8,2	±	34,1	$4{,}5 \cdot 10^{-3}$	9	·	0,8	
Filtrat	·	·	0,810	81,0	42,4	++	52,0	$2{,}4 \cdot 10^{-1}$	502	·	459,6	Farbreaktion: violett Pastentest: Wert aus 1/1, 1/10, 1/100 ermittelt
Gesamt	·	·	·	222,8	116,6	·	·	·	932	·	815,4	
Filtrat in % von Gesamt	·	·	·	·	36,5	·	·	·	53,9	·	56,0	

sich — wenn man geringste, eventuell beim Nachwaschen aus der Säule schon eluierte Anteile an Indol-3-essigsäure vernachlässigt — nicht um freie Indol-3-essigsäure handeln. Da uns ein reines Präparat von Indol-3-acetonitril nicht zur Verfügung stand, konnte nicht untersucht werden, ob dieses etwa die Säule durchläuft und im Filtrat aufzufinden ist. Bis zur Durchführung entsprechender Versuche mit reinem Indol-3-acetonitril muß also die Frage ungeklärt bleiben, ob es sich bei den im Filtrat vorliegenden I-3-E-Äquivalenten um das Indol-3-acetonitril handeln kann oder nicht. Der Gesamtgehalt der Blumenkohl-Trockensubstanz an I-3-E-Äquivalenten ergab sich (kolorimetrisch bestimmt) mit 116,6 mg-% und liegt damit bemerkenswert hoch.

Es wäre nun zu erwarten, daß in den einzelnen Säulenabschnitten des Chromatogrammes im Pastentest den kolorimetrisch bestimmten I-3-E-Äquivalenten entsprechende I-3-E-Wirkungsäquivalente gefunden werden. Da der biologische Test mit größeren Fehlern behaftet ist, müssen kleinere Differenzen wohl unberücksichtigt bleiben. Dies ist beispielsweise bei den Abschnitten I und IV des Blumenkohl-Chromatogrammes der Fall, bei denen keine um eine Größenordnung verschiedenen Differenzen auftreten. Am Abschnitt II aber wurde im biologischen Test um das 5,06fache mehr an Wirkungsäquivalenten gefunden, als dem kolorimetrischen Wert entspricht und im Abschnitt III sogar um das 6,5fache mehr. Dieses Mehr an Wirkungsäquivalenten gegenüber der vorhandenen, kolorimetrisch bestimmbaren Indol-3-essigsäure kann auf zweierlei Weise erklärt werden: entweder dadurch, daß man annimmt, daß die Indol-3-essigsäure in einer Form, etwa in einer Verbindung oder in einer Kombination mit einem oder mehreren anderen Stoffen vorliegt, in welcher sie biologisch etwa 6fach wirksamer ist als in reiner Form; oder aber dadurch, daß man annimmt, daß neben der Indol-3-essigsäure noch ein zweiter, nicht indolartiger und daher kolorimetrisch nicht erfaßter Wuchsstoff vorliegt. Letztere Deutung ist insofern unwahrscheinlich, als die Verteilung dieses (unbekannten) Wuchsstoffes im Chromatogramm fast die gleiche ist wie jene der Indol-3-essigsäure selbst. Andererseits zeigen die an dem Filtrat aus dem Chromatogramm erhaltenen Werte, daß in diesem um das 7,0fache mehr an biologisch ermittelten Wirkungsäquivalenten als an kolorimetrischen I-3-E-Äquivalenten vorliegt. Diese aus der Differenz zwischen den kolorimetrisch bestimmten I-3-E-Äquivalenten und den biologischen Testergebnissen (ausgedrückt in I-3-E-Wirkungsäquivalenten) erhaltenen Zahlen wurden in Tabelle 4 (wie in den folgenden Tabellen) als Werte für „nicht indolartige Wuchsstoffe" bezeichnet. Hiermit soll jedoch keine Beantwortung der eben aufgeworfenen Frage vorweggenommen sein, ob es sich dabei tatsächlich um nicht indolartige Wuchsstoffe handelt (welche sich nur zufällig hier ähnlich im Chromatogramm verteilten wie die Indol-3-

essigsäure) oder ob es sich nur um eine wirksamere Form eines indolartigen Wuchsstoffes handelt. Eine endgültige Entscheidung dieser Frage muß späteren Versuchen überlassen bleiben.

Die Tabellen 5 und 6 geben eine Übersicht über die bei Weißkraut und bei Wirsingkohl erhaltenen Ergebnisse, Tabellen 7 und 8 dagegen jene von Tomaten und Kren. Wie schon früher an Hand der Wuchsstofftestung festgestellt wurde (Linser 1939/40) sind die Brassiceen außerordentlich wuchsstoffhaltige Pflanzen und die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß die indolartigen Wuchsstoffe an diesem Wuchsstoffreichtum großen Anteil haben. Bei Weißkraut wurden 45,5 mg-% Indol-3-essigsäureäquivalente bezogen auf Trockensubstanz gefunden (von welchen fast $^2/_3$ Indol-3-essigsäure selbst sind), bei Wirsingkohl 82,2 mg-% (davon $^4/_5$ Indol-3-essigsäure).

Bei der wuchsstoffarmen Tomatenpflanze wurden nur 2,8 mg-% Indol-3-essigsäure gefunden; beim Kren war leider die kolorimetrische Bestimmung im Filtrat wegen Eigenfarbe des Filtrates nicht auswertbar. Die in den Tabellen 7 und 8 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß bei „wuchsstoffarmen" Pflanzen auch die chromatographische Trennung keine (etwa verdeckten oder „maskierten") Wuchsstoffmengen erkennbar werden läßt und daß bei ihnen auch die Gehalte an Indolkörpern niedrig liegen.

Um einen Überblick über die Verteilung der Wuchsstoffe über eine ganze Pflanze zu erhalten und um festzustellen, ob sich die in den einzelnen Organen einer Pflanze vorliegenden Wuchsstoffe bei Anwendung der chromatographischen Methode verschiedenartig verhalten, wurden die einzelnen Organe einer 250 g schweren Sprossenkohlpflanze voneinander getrennt aufgearbeitet, und zwar wurde der Vegetationskegel zusammen mit den 7 jüngsten Blättern von 0,5—8,0 cm Länge als „Sproß" aufgearbeitet; die Ergebnisse davon finden sich in Tabelle 9. Die Ergebnisse für die „Blätter" (verwendet wurde die Blattlamina des 8.—11. Blattes) sind in Tabelle 10, jene für die „Blattstiele" (des 8.—12. Blattes) in Tabelle 11, jene für den „Stamm" in Tabelle 12 zusammengestellt, während über jene für die „Wurzeln" Tabelle 13 Auskunft gibt.

Während bei allen Organen der Sprossenkohlpflanze analog zu den bei den anderen untersuchten Brassiceen gefundenen Ergebnissen die im Filtrat vorliegenden kolorimetrischen I-3-E-Äquivalente nur einen kleineren Teil (25—38%) der gesamten Menge ausmachen, ist es bei dem im biologischen Test gefundenen Werten umgekehrt so, daß der größte Teil (79—49%) der I-3-E-Wirkungsäquivalente im Filtrat gelöst und nur ein kleiner Teil an der Säule adsorbiert bleibt. Bloß bei den Wurzeln sinkt der Anteil des Filtrats auf nur 42,9% ab.

Tabelle 5. *Brassica oleracea var. capitata L. f. alba (Kraut); Durchschnittsmaterial der oberirdischen Teile einer Pflanze von 1200 g Gewicht. Verwendete Menge an Pflanzenmaterial: 40,70 g Frischsubstanz = 4,42 g Trockensubstanz (= 10,8%).*

	Kolorimetrische Methode					Pastenteste				Differenz		
Schicht	Länge des Säulenabschnittes in cm	Fluoreszenzfarben von oben nach unten	Extinktion	Indol-3-essigsäure-Äquivalente in dem Abschnitt	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz		Z %	Eichwert	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz	nicht wuchsstoffwirksame Indolkörper (in Äquivalenten)	Nicht indolartige Wuchsstoffe (in Äquivalenten)	Bemerkung über die Beurteilung des kolorimetrischen wie auch des biologischen Testergebnisses
Chromatogramme I	4	gelb	0,350	17,5	4,0	−	53,8	$1{,}1 \cdot 10^{-2}$	10,0	·	6,0	
Chromatogramme II	7	—	0,612	30,6	6,9	−	63,3	$2{,}2 \cdot 10^{-2}$	19,9	·	13,0	
Chromatogramme III	7	—	0,902	45,1	10,2	+	60,2	$7{,}0 \cdot 10^{-2}$	63,4	·	53,2	
Chromatogramme IV	4	blau	0,590	29,5	6,7	±	66,1	$3{,}0 \cdot 10^{-2}$	27,1	·	20,4	
Filtrat	·	·	0,782	78,2	17,7	++	69,1	$4{,}0 \cdot 10^{-1}$	1131,2	·	1113,5	Pastentest: Wert aus 1/10, 1/100 ermittelt
Gesamt	·	·	·	·	45,5	·	·	·	1251,6	·	1206,1	
Filtrat in % von Gesamt	·	·	·	·	38,9	·	·	·	90,2	·	94,0	

Tabelle 6. *Brassisa oleracea var. sabauda (Wirsing-Kohl); Durchschnittsmaterial der oberirdischen Teile einer jungen, 200 g schweren Pflanze. Verwendete Menge an Pflanzenmaterial: 27,36 g Frischsubstanz = 2,91 g Trockensubstanz (= 10,6%).*

	Kolorimetrische Methode					Pastenteste			Differenz		
Schicht	Länge des Säulenabschnittes in cm	Fluoreszenzfarben von oben nach unten	Extinktion	Indol-3-essigsäure-Äquivalente in dem Abschnitt	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz		Z %	Eichwert	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz	Nicht wuchsstoffwirksame Indolkörper (in Äquivalenten)	Nicht indolartige Wuchsstoffe (in Äquivalenten)	Bemerkung über die Beurteilung des kolorimetrischen wie auch des biologischen Testergebnisses
Chromatogramme I	2	grau / gelb / grau	1,20	60,0	20,6	+	63,9	$3,0 \cdot 10^{-2}$	41,2	·	20,6	
Chromatogramme II	5	bläulich	1,766	88,3	30,4	+	64,3	$3,1 \cdot 10^{-2}$	42,6	·	12,2	
Chromatogramme III	6	blau	0,618	30,9	10,6	− −	21,8	$2,1 \cdot 10^{-3}$	2,9	7,7	·	
Chromatogramme IV	9	rosa	0,230	11,5	3,9	−	7,7	$4,5 \cdot 10^{-4}$	0,6	3,3	·	
Filtrat	·	·	0,971	48,5	16,7	+	76,2	$4,0 \cdot 10^{-1}$	550,0	·	533,3	Pastentest: Wert aus Lage des überhöhten Maximums (1/1, 1/10, 1/100) ermittelt
Gesamt	·	·	·	·	82,2	·	·	·	637,3	11,0	566,1	
Filtrat in % von Gesamt	·	·	·	·	20,3	·	·	·	86,2	·	94,1	

Tabelle 7. *Solanum lycopersicum (Tomate); oberirdische Teile einer erwachsenen Pflanze. Verwendete Menge an Pflanzenmaterial: 10,62 g Frischsubstanz = 1,17 g Trockensubstanz (= 11,0%).*

Kolorimetrische Methode						Pastenteste				Differenz		
Schicht	Länge des Säulenabschnittes in cm	Fluoreszenzfarben von oben nach unten	Extinktion	Indol-3-essigsäure-Äquivalente in dem Abschnitt	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz		Z %	Eichwert	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz	Nicht wuchsstoffwirksame Indolkörper (in Äquivalenten)	Nicht indolartige Wuchsstoffe (in Äquivalenten)	Bemerkung über die Beurteilung der kolorimetrischen wie auch des biologischen Testergebnisses
Chromatogramme I	2	gelb rosa gelb	0,01	0,5	0,4	±	1,8	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,3	0,1	·	
Chromatogramme II	4	blau	0,005	0,25	0,2	±	6,8	$4,0 \cdot 10^{-4}$	1,4	·	1,2	
Chromatogramme III	12	rosa	0,02	1,0	0,9	±	1,8	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,3	0,6	·	
Chromatogramme IV	4	rötlich	0,031	1,5	1,3	±	−0,7	0	0,0	1,3	·	
Filtrat	·	·	0,000	0,0	0,0	±	28,2	$4,6 \cdot 10^{-3}$	15,7	·	15,7	Pastentest: Wert aus 1/1, 1/10 ermittelt
Gesamt	·	·	·	·	2,8	·	·	·	17,7	2,0	16,9	
Filtrat in % von Gesamt	·	·	·	·	0,0	·	·	·	88,7	·	92,9	

Tabelle 8. *Cochlearia armoracea (Kren); oberirdische Teile einer alten Pflanze. Verwendete Menge an Pflanzenmaterial: 50,31 g Frischsubstanz = 6,67 g Trockensubstanz (= 13,3%).*

	Kolorimetrische Methode					Pastenteste				Differenz		
Schicht	Länge des Säulenabschnittes in cm	Fluoreszenzfarben von oben nach unten	Extinktion	Indol-3-essigsäure-Äquivalente in dem Abschnitt	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz		Z %	Eichwert	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz	Nicht wuchsstoffwirksame Indolkörper (in Äquivalenten)	Nicht indolartige Wuchsstoffe (in Äquivalenten)	Bemerkung über die Beurteilung des kolorimetrischen wie auch des biologischen Testergebnisses
Chromatogramme I	3	gelblich / bräunlich / gelblich	0,02	1,5	0,2	±	− 2,4	0	0,0	0,2	·	
II	6	—	0,042	2,1	0,3	±	− 11,4	0	0,0	0,3	·	
III	13	—	0,132	—	—	±	− 4,8	0	0,0	·	·	kolorimetrisch bestimmt, wegen anderen Farbtons unbrauchbar
IV	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Filtrat	·	·	1,11	·	·	+	21,3	$2{,}0 \cdot 10^{-3}$	0,9	·	·	Pastentest: Wert aus 1/1 (unsicher). Kolorimetrische Bestimmung wegen Eigenfarbe unmöglich
Gesamt	·	·	·	·	0,5	·	·	·	0,9	·	·	
Filtrat in % von Gesamt	·	·	·	·	·	·	·	·	100,0	·	·	

Tabelle 9. *Brassica oleracea var. gemmifera (Sprossenkohl); Sproß einer 250 g schweren, jungen Pflanze (Vegetationskegel mit den 7 nachfolgenden Blättern von 0,5—8,0 cm Länge). Verwendete Menge an Pflanzenmaterial: 5,604 g Frischsubstanz = 0,784 g Trockensubstanz (= 14,0%).*

Kolorimetrische Methode						Pastenteste				Differenz		
Schicht	Länge des Säulenabschnittes in cm	Fluoreszenzfarben von oben nach unten	Extinktion	Idol-3-essigsäure-Äquivalente in dem Abschnitt	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz		Z %	Eichwert	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz	Nicht wuchsstoffwirksame Indolkörper (in Äquivalenten)	Nicht indolartige Wuchsstoffe (in Äquivalenten)	Bemerkung über die Beurteilung des kolorimetrischen wie auch des biologischen Testergebnisses
Chromatogramme I	3	rosa gelb braun blau	0,831	41,6	53,1	+	69,7	$3,0 \cdot 10^{-2}$	153	·	99,9	
Chromatogramme II	5	rosa	0,051	2,6	3,3	±	0,1	$1,10^{-4}$	0	3,3	·	Wegen Kleinheit des Pastentestwertes keine genaue Angabe möglich
Chromatogramme III	10	rosa	0,072	3,6	4,6	−	19,7	$1,9 \cdot 10^{-3}$	10	·	5,4	
Chromatogramme IV	4	rosa	0,101	5,1	6,5	−	20,9	$2,0 \cdot 10^{-3}$	10	·	3,5	
Filtrat	·	·	·	18,0	23,0	++	47,8	$1,8 \cdot 10^{-1}$	918	·	895	Pastentest: Wert aus 1/1, 1/10, 1/100 ermittelt
Gesamt	·	·	·	70,9	90,5	·	·	·	1091	3,3	1003,8	
Filtrat in % von Gesamt	·	·	·	·	25,4	·	·	·	84,1		86,1	

Tabelle 10. *Brassica oleracea var. gemmifera (Sprossenkohl); Blätter einer 250 g schweren, jungen Pflanze (8.—11. Blatt, 9—15 cm lang). Verwendete Menge an Pflanzenmaterial: 19,33 g Frischsubstanz = 2,73 g Trockensubstanz (= 14,1%).*

Kolorimetrische Methode						Pastenteste				Differenz		
Schicht	Länge des Säulenabschnittes in cm	Fluoreszenzfarben von oben nach unten	Extinktion	Indol-3-essigsäure-Äquivalente in dem Abschnitt	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz		Z %	Eichwert	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz	Nicht wuchsstoffwirksame Indolkörper (in Äquivalenten)	Nicht indolartige Wuchsstoffe (in Äquivalenten)	Bemerkung über die Beurteilung des kolorimetrischen wie auch des biologischen Testergebnisses
Chromatogramme												
I	3	grau grün grau grün	0,131	6,5	2,4	—	30,3	$3{,}8 \cdot 10^{-3}$	5,6	·	3,2	
II	6	grünlich	0,452	22,6	8,3	—	29,0	$3{,}3 \cdot 10^{-3}$	4,8	3,5	·	
III	9	grünlich	0,479	23,9	8,8	±	33,3	$4{,}2 \cdot 10^{-3}$	6,1	2,7	·	
IV	4	gelb rot	0,040	2,1	0,7	±	1,4	$1 \cdot 10^{-4}$	0,1	0,6	·	
Filtrat	·	·	·	·	·	+++	10,7	$3 \cdot 10^{-2}$	439,0	·	·	Kolorimetrische Bestimmung wegen Eigenfarbe nicht möglich. Pastentest: Wert aus 1/1, 1/10
Gesamt	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Filtrat in % von Gesamt	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	

Tabelle 11. *Brassica oleracea var. gemmifera (Sprossenkohl); Blattstiele der 8.—12. Blätter einer 250 g schweren, jungen Pflanze. Verwendete Menge an Pflanzenmaterial 15,72 g Frischsubstanz = 1,22 g Trockensubstanz (= 7,8%).*

	Kolorimetrische Methode						Pastenteste				Differenz		
Schicht	Länge des Säulenabschnittes in cm	Fluoreszenzfarben von oben nach unten	Extinktion	Indol-3-essigsäure-Äquivalente in dem Abschnitt	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz		Z %	Eichwert	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz	Nicht wuchsstoffwirksame Indolkörper (in Äquivalenten)	Nicht indolartige Wuchsstoffe (in Äquivalenten)	Bemerkung über die Beurteilung des kolorimetrischen wie auch des biologischen Testergebnisses
Chromatogramme I	3	gelb, grau	0,210	10,5	8,6	—	24,4	$2,4 \cdot 10^{-3}$	7,9	0,7	·	
II	6	blau, rosa	0,249	12,5	10,2	—	40,9	$6,2 \cdot 10^{-3}$	21,8	·	11,6	
III	13	rosa	0,031	1,6	1,3	±	2,7	$2,0 \cdot 10^{-4}$	0,7	0,6	·	
IV	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Filtrat	·	·	·	16,2	8,1	+	63,4	$3,5 \cdot 10^{-2}$	115,0	·	106,9	Pastentest: Wert aus 1/1
Gesamt	·	·	·	·	28,2	·	·	·	145,4	1,3	118,5	
Filtrat in % von Gesamt	·	·	·	·	28,7	·	·	·	79,2	·	90,2	

Tabelle 12. *Brassica oleracea var. gemmifera (Sprossenkohl); Stamm einer 250 g schweren jungen Pflanze (50 cm lang). Verwendete Menge an Pflanzenmaterial: 14,75 g Frischsubstanz = 1,25 g Trockensubstanz (= 8,5%).*

	Kolorimetrische Methode					Pastenteste				Differenz		
Schicht	Länge des Säulenabschnittes in cm	Fluoreszenzfarben von oben nach unten	Extinktion	Indol-3-essigsäure-Äquivalente in dem Abschnitt	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz		Z %	Eichwert	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz	Nicht wuchsstoffwirksame Indolkörper (in Äquivalenten)	Nicht indolartige Wuchsstoffe (in Äquivalenten)	Bemerkung über die Beurteilung des kolorimetrischen wie auch des biologischen Testergebnisses
Chromatogramme I	3	rosa gelb rosa	0,129	6,5	5,1	—	6,7	$4{,}0 \cdot 10^{-4}$	1,3	3,8	—	
Chromatogramme II	6	blau	0,253	12,7	10,1	—	20,5	$2{,}0 \cdot 10^{-3}$	6,4	3,7	—	
Chromatogramme III	9	rosa	0,110	5,5	4,4	±	−2,6	0	0,0	4,4	—	
Chromatogramme IV	4	rosa	0,151	7,5	6,0	−	−4,2	0	0,0	6,0	—	
Filtrat	·	·	0,381	19,1	15,6	±	68,1	$3{,}5 \cdot 10^{-2}$	111,8	—	92,7	Pastentest: Wert aus 1/1, 1/10 ermittelt
Gesamt	·	·	·	·	41,2	·	·	·	119,5	17,9	92,7	
Filtrat in % von Gesamt	·	·	·	·	37,9	·	·	·	93,5	·	100,0	

Tabelle 13. *Brassica oleracea var. gemmifera (Sprossenkohl); Wurzeln einer 250 g schweren jungen Pflanze. Verwendete Menge an Pflanzenmaterial: 7,25 g Frischsubstanz = 1,82 g Trockensubstanz (= 25,1%).*

Kolorimetrische Methode						Pastenteste				Differenz		
Schicht	Länge des Säulenabschnittes in cm	Fluoreszenzfarben von oben nach unten	Extinktion	Indol-3-essigsäure-Äquivalente in dem Abschnitt	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz		Z %	Eichwert	mg-% Indol-3-essigsäure-Äquivalente in der Trockensubstanz	Nicht wuchsstoffwirksame Indolkörper (in Äquivalenten)	Nicht indolartige Wuchsstoffe (in Äquivalenten)	Bemerkung über die Beurteilung des kolorimetrischen wie auch des biologischen Testergebnisses
Chromatogramme I	2,5	grau gelb grau blau	0,307	15,3	8,4	—	25,0	$2{,}7 \cdot 10^{-3}$	5,9	2,5	.	
II	7,5	—	0,199	10,0	5,5	±	3,9	$2{,}3 \cdot 10^{-4}$	0,4	5,1	.	
III	8		0,020	0,1	0,6	±	−1,9	0	0,0	0,6	.	
IV	4	—	0,105	5,2	2,9	±	0,6	$1 \cdot 10^{-4}$	0,1	2,8	.	
Filtrat	.	.	0,322	16,1	8,9	+	23,1	$2{,}2 \cdot 10^{-3}$	4,8	4,1	.	Pastentest: Wert nur 1/1.
Gesamt	.	.	.	.	26,3	.	.	.	11,2	15,0	.	
Filtrat in % von Gesamt	.	.	.	.	33,8	.	.	.	42,9	27,2	.	

Betrachtet man bei den einzelnen Organen den Anteil an kolorimetrisch bestimmten Gesamt-I-3-E-Äquivalenten in Prozenten der biologisch ermittelten Wirkungsäquivalente, so erhält man folgende Übersicht:

Sproß	8,27%	Stamm	34,5%
Blattstiele	19,4 %	Wurzeln.	235 %

Der Anteil der indolartigen Wuchsstoffe an dem Gesamtwirkungsäquivalent nimmt in den einzelnen Organen der Pflanze also in der Richtung von der physiologischen Spitze zur physiologischen Basis hin stark zu. Eine Betrachtung der absoluten Werte der Wirkungsäquivalente (vgl. Abb. 1) zeigt aber, daß diese Zunahme nur eine relative ist und nicht einer Zunahme des Gehaltes an Indolkörpern, sondern vielmehr einer starken Abnahme des „Gehaltes" an nichtindolartigen Wirkungsäquivalenten von den oberen zu den unteren Partien der Pflanze hin zu verdanken ist, denn die *absolute Menge an nichtindolartigen Wirkungsäquivalenten nimmt in der gleichen Richtung ebenso wie deren relativer Anteil stark ab.*

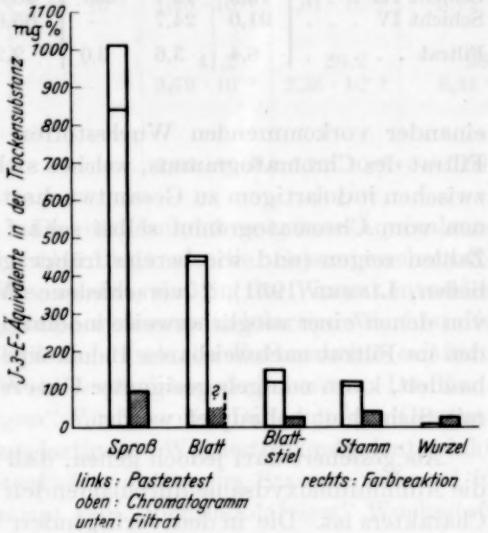


Abb. 1. Verhältnis der im Pastentest gefundenen Wuchstoffmengen zu den kolorimetrisch feststellbaren Indol-3-essigsäureäquivalenten bei den einzelnen Organen von Sprossenkohl.

In den einzelnen Chromatogrammabschnitten sowie in den Filtraten wurden Verhältniszahlen zwischen „indolartigen" und Gesamtmengen von Wuchsstoffen (in Wirkungsäquivalenten) gefunden, welche zusammen mit jenen der übrigen Brassiceen-Versuche in Tabelle 14 zusammengefaßt sind.

Sie zeigen, daß in den Säulenabschnitten *kein* auch nur annähernd konstantes Verhältnis zwischen den indolartigen (die Perchlorsäurefarbreaktion gebenden) Stoffen und den biologischen Wuchsstoffwirkungs-(I-3-E) Äquivalenten besteht, so daß die Annahme, daß die indolartigen Wuchsstoffe in einer besonderen, ihre Wirkung steigernden Form vorliegen (vgl. S. 574), sehr unwahrscheinlich wird. Es darf mit viel mehr Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß auch in den Säulenabschnitten noch keine befriedigende Trennung zwischen 2 neben-

Tabelle 14. *Verhältniszahlen zwischen indolartigen und Gesamtmengen an Wuchsstoffen bei den Brassiceen-Versuchen (kolorimetrisch ermittelte I-3-E-Äquivalente in Prozent der biologischen Wirkungsäquivalente).*

	Blumenkohl	Weißkraut	Wirsingkohl	Sprossenkohl				
	oberirdische Organe			Sproß	Blatt	Blattstiel	Stamm	Wurzel
Schicht I	46,1	40,0	50,0	34,7	42,8	109	393	142
Schicht II . . .	16,4	34,7	71,5	—	173	46,8	158	1375
Schicht III . . .	13,3	16,1	366	46,0	144	186	—	—
Schicht IV . . .	91,0	24,7	—	65,0	—	—	—	—
Filtrat	8,4	3,6	3,0	2,2	—	14,1	17,1	186

einander vorkommenden Wuchsstoffen erzielt worden ist. Auch im Filtrat des Chromatogramms, welches sich hinsichtlich des Verhältnisses zwischen indolartigem zu Gesamtwuchsstoff bei den oberirdischen Organen vom Chromatogramm selbst scharf unterscheidet, liegen, wie die Zahlen zeigen (und wie bereits früher geschilderte Versuche erkennen ließen, LINSER 1951), 2 verschiedene Wuchsstoffe nebeneinander vor, von denen einer möglicherweise indolartiger Natur ist. Daß es sich bei den im Filtrat nachweisbaren Indolkörpern tatsächlich um Wuchsstoffe handelt, kann mangels geeigneter Untersuchungen bisher ja noch nicht mit Sicherheit behauptet werden.

Als gesichert darf jedoch gelten, daß mindestens ein großer Teil der die Aluminiumoxydsäule durchlaufenden Wuchsstoffe *nicht* indolartigen Charakters ist. Die in den vorliegenden Versuchen gewonnenen Zahlen bieten die Möglichkeit, einen Rückschluß auf die Wuchsstoffkonzentrationen in den Gewebssäften der untersuchten Pflanzen zu ziehen. Zu diesem Zweck mag als grobe Annäherung an die tatsächlichen Verhältnisse die Annahme gestattet sein, daß das gesamte, der Pflanze durch Trocknung entziehbare Wasser der lebenden Pflanze als Lösungsmittel für ihre Wuchsstoffe zur Verfügung stehe. Für die einzelnen Organe der zum Versuch verwendeten Sprossenkohlpflanze errechnen sich danach die in Tabelle 15 zusammengestellten Werte. Aus ihnen ergibt sich, daß die Konzentration an Indol-3-essigsäure, welche in der wäßrigen Phase des Sprosses $1{,}47 \cdot 10^{-2}$% beträgt, basalwärts bis zum Stamm auf $2{,}38 \cdot 10^{-3}$, also auf fast $^1/_{10}$ abfällt, in der Wurzel aber wieder auf $8{,}81 \cdot 10^{-3}$ ansteigt. Die Gesamtmenge an Wuchsstoffen (in I-3-E-Wirkungsäquivalenten), welche im Sproß $1{,}78 \cdot 10^{-1}$% beträgt und damit 12mal so hoch liegt wie die Indol-3-essigsäure-Konzentration, fällt basalwärts bis zum Stamm auf $1{,}01 \cdot 10^{-2}$% auf etwa $^1/_{18}$ ab und liegt mit $3{,}72 \cdot 10^{-3}$% in der Wurzel noch tiefer, nämlich auf $^1/_{48}$ der Wuchsstoff-

Tabelle 15. *Übersicht über die aus den kolorimetrisch und im Pastentest gewonnenen Zahlen errechenbaren, auf den Wassergehalt der Organe bezogenen „Wuchsstoffkonzentrationen" in den Organen von Sprossenkohl (vgl. Tabelle 9—13).*

	Sproß	Blatt	Blattstiel	Stamm	Wurzel
Trockensubstanz %	14,0	14,1	8,5	7,8	25,1
Wasser g für 100 g Trockensubstanz	614,3	609,2	1076,4	1182,0	298,4
mg I-3-E-Äquivalente Pastentest	1090,9	455,5	151,1	119,5	11,1
Wuchsstoffkonzentration %	$1{,}78 \cdot 10^{-1}$	$7{,}49 \cdot 10^{-2}$	$1{,}40 \cdot 10^{-2}$	$1{,}01 \cdot 10^{-2}$	$3{,}72 \cdot 10^{-3}$
mg I-3-E-Äquivalente Farbreaktion	90,5	—	41,2	28,2	26,3
Wuchsstoffkonzentration %	$1{,}47 \cdot 10^{-2}$	—	$3{,}79 \cdot 10^{-3}$	$2{,}38 \cdot 10^{-3}$	$8{,}81 \cdot 10^{-3}$
Differenz zwischen Gesamtwuchsstoff und indolartigem Wuchsstoff . .	$1{,}63 \cdot 10^{-1}$	—	$1{,}02 \cdot 10^{-2}$	$7{,}72\ 10^{-3}$	$-5{,}09 \cdot 10^{-3}$

konzentration des Sprosses[1]. Da die Indol-3-essigsäure-Äquivalentkonzentration in der Wurzel höher liegt als die Gesamtwuchsstoff-Konzentration, muß geschlossen werden, daß in der Wurzel entweder weniger stark als Indol-3-essigsäure wirksame indolartige Wuchsstoffe vorliegen oder aber daß ein Teil der durch die Farbreaktion erfaßten Indolkörper überhaupt keine Wuchsstoffwirksamkeit besitzt. Die Konzentration der „nichtindolartigen" Wuchsstoffe (Differenz aus Gesamtwuchsstoffäquivalent und „indolartigem" Wuchsstoffäquivalent) sinkt von $1{,}63 \cdot 10^{-1}$% im Sproß basalwärts auf $^1/_{21}$ im Stamm, während in der Wurzel anscheinend überhaupt kein „nichtindolartiger" Wuchsstoff vorliegt.

Zusammenfassung.

1. In Pflanzenextrakten wurden nach chromatographischer Trennung an Aluminiumoxydsäulen pflanzliche Wuchsstoffe mit Hilfe des Pastentestes nach Linser und vergleichsweise dazu die Indol-3-essigsäure (bzw. ähnliche Indolkörper) mit Hilfe der Perchlorsäurereaktion nach Gordon und Weber kolorimetrisch quantitativ bestimmt. Sowohl die biologischen Testergebnisse wie auch die kolorimetrisch gewonnenen Zahlen wurden in Indol-3-essigsäure-Äquivalenten ausgedrückt.

2. Da der bei der Perchlorsäurereaktion nach Gordon und Weber gebildete Farbstoff lichtempfindlich ist, wird empfohlen, die Reaktion im Dunkeln bzw. bei nur schwacher künstlicher Beleuchtung durchzuführen.

[1] Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß die zur Aufarbeitung gelangenden Wurzeln bereits bei der Bestimmung des Frischgewichtes einen Teil ihres natürlichen Wassergehaltes eingebüßt haben.

3. Die bei Brassiceen an Aluminiumoxydsäulen adsorbierbaren Wuchsstoffmengen zeigen im biologischen Test im allgemeinen höhere Wirkungswerte, als dem Gehalt an Indol-3-essigsäure entspricht. Es wird vermutet, daß außer der Indol-3-essigsäure noch ein zweiter, nicht indolartiger Wuchsstoff an Aluminiumoxyd adsorbiert wird.

4. In Chromatogrammfiltraten von Brassiceen gibt die Perchlorsäurereaktion beträchtliche Mengen von indolartigen Stoffen an, welche jedoch nicht Indol-3-essigsäure sein dürften, da diese an der Al_2O_3-Säule adsorbiert wird. In den gleichen Filtraten können große Mengen nichtindolartigen Wuchsstoffs nachgewiesen werden.

5. Sowohl die absolute Menge als auch der Anteil der nicht-indolartigen Wuchsstoffe nimmt vom Sproß basalwärts bis zur Wurzel stark ab, dagegen nimmt der relative Anteil an indolartigen Wuchsstoffen von der physiologischen Spitze zur physiologischen Basis stark zu.

6. Die Gesamtwuchsstoffkonzentration in den Gewebssäften von Sprossenkohl nähert sich im Sproß dem Wert $2 \cdot 10^{-1}$%, in der Wurzel jenem von $4 \cdot 10^{-3}$% (I-3-E-Wirkungsäquivalente) an.

7. In den oberirdischen Teilen von Tomatenpflanzen wurden kolorimetrisch nur 2,8 mg-% (I-3-E-Äquivalente) gefunden, während für die Gemische oberirdischer Organe von Brassiceen Werte von 45,5 bis 116,6 mg-% erhalten wurden.

Literatur.

BEIN, M., R. SIGNER u. W. H. SCHOPFER: Einfluß von Penicillin auf die Wurzelkultur (Zea mays). Experientia (Basel) **3**, 291 (1947). — DENFFER, D. v., M. BEHRENS u. A. FISCHER: Papierelektrophoretische Trennung von Indolderivaten aus Pflanzenextrakten. Naturwiss. **39**, 258 (1952). — Papierchromatographischer und papierelektrophoretischer Nachweis des β-Indolacetonitrils und des β-Indolacetaldehyds in Extrakten aus Kohlpfanzen. Naturwiss. **39**, 550 (1952). — GORDON, S. A., and R. P. WEBER: Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiol. **26**, 192 (1951). — JERCHEL, D., u. R. MÜLLER: Papierchromatographie der Indol-3-essigsäure. Naturwiss. **38**, 561 (1951). — LINSER, H.: Zur Methodik der Wuchsstoffbestimmung. Planta (Berl.) **28**, 227 (1938). — Zur Methodik der Wuchsstoffbestimmung. II. Planta (Berl.) **29**, 392 (1939). — Über das Vorkommen von Hemmstoff in Pflanzenextrakten sowie über das Verhältnis von Wuchsstoffabgabe und Wuchsstoffgehalt bei Pflanzen oder Pflanzenextrakten. Planta (Berl.) **31**, 32 (1940). — Versuche zur chromatographischen Trennung von Wuchs- und Hemmstoffen. Planta (Berl.) **39**, 377 (1951). — LUCKWILL, L. C.: Application of paper chromatography to the separation and identification of auxins and growth inhibitors. Nature (Lond.) **169**, 365 (1952). — MITCHELL, J. W., and W. G. BRUNSTETTER: Colorimetric methods for the quantitative estimation of Indole-3-acetic-acid. Bot. Gaz. **100**, 802 (1939).

Doz. Dr. HANS LINSER, Linz (Österreich), Landstraße 115.

Panta, Bd. 41, S. 589—612 (1953).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Rostock.

ÜBER DIE ABHÄNGIGKEIT DER WIRKSTOFFBILDUNG VON LICHT UND PHOTOSYNTHESE.

Von

HANNE-LORE WIEDOW und HERMANN v. GUTTENBERG.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. Dezember 1952.)

I. Einleitung.

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise dafür, daß verschiedene lebensnotwendige Wirkstoffe der höheren Pflanzen nur am Licht gebildet werden. Für die *Wuchsstoffe des Streckungswachstums* (Auxine) haben dies vor allem folgende Autoren nachgewiesen. OVERBEEK (1933) fand, daß in etiolierten *Raphanus*-Kotyledonen der Wuchsstoff abnimmt und am Licht gezogene eine doppelte Menge davon besitzen; zu dem Reservewuchsstoff des Samens müsse also am Licht neugebildeter hinzukommen. NAVEZ (1933) erhielt ein ganz ähnliches Ergebnis mit Lupinenkeimlingen, THIMANN und SKOOG (1934) fanden entsprechende Verhältnisse bei *Vicia Faba*. GUTTENBERG und SEGELITZ (1938) sowie SEGELITZ (1938) stellten fest, daß abgeschnittene Keimsprosse und isolierte Wurzelspitzen vom Mais am Licht ergrünen und Wuchsstoff bilden; im Dunkeln sind sie dazu nicht befähigt. AVERY (1935) sowie AVERY, BURKHOLDER und CREIGHTON (1937) verdunkelten Tabakpflanzen. Es ergab sich, daß sie nach mehrtägiger Verdunklung keine testbaren Wuchsstoffmengen mehr besaßen. Die letztgenannten Autoren waren die ersten und bisher einzigen, die ihre Aufmerksamkeit auch der Frage zuwendeten, ob eine solche Wuchsstoffbildung auch in CO_2-freier Luft vor sich gehe oder nicht, d. h. ob die Wuchsstoffbildung am Licht eine Beziehung zur Photosynthese aufweise. Das Ergebnis ihrer Versuche war, daß am Tageslicht ohne CO_2 gezogene Pflanzen mehr Wuchsstoff besaßen als etiolierte, aber weniger als Kontrollpflanzen in Normalluft am Licht. Zwei Versuche dauerten $4^1/_2$ Tage, einer 10, getestet wurde nach WENT. Erhöhte CO_2-Zufuhr förderte die Wuchsstoffproduktion.

Die Photosynthese erhöhte den Zuckergehalt der Blätter. Es besteht somit auch die Möglichkeit, daß die Erhöhung des Zuckerspiegels für die Wuchsstoffbildung maßgeblich ist. Diese Frage wurde besonders von LAIBACH (1941) geprüft. Gurkenkeimlingen wurden verschiedene

* Herrn Prof. Dr. OTTO RENNER zu seinem 70. Geburtstag gewidmet.

Zuckerarten in einen Kotyledon eingespritzt, der zweite erhielt ebensoviel Wasser. Solche Pflanzen krümmten sich vom zuckerversorgten Kotyledon hinweg, woraus geschlossen wird, daß in diesem der Wuchsstoffgehalt vermehrt worden war. Allerdings wirkt eingespritztes Heteroauxin (0,005% $= 5 \times 10^{-5}$ g/cm³) rascher und stärker. LAIBACH kommt zu der Annahme, daß der Wuchsstoffgehalt vom Stärke-Zuckergleichgewicht abhängt, und zwar soll er durch die Hydrolyse der Stärke vermehrt werden. In einer 2. Arbeit (1942) wird darauf hingewiesen, daß verschiedene Faktoren, die Epinastie bewirken, so z. B. Äthylenbehandlung oder Verdunklung, auch Stärkehydrolyse herbeiführen. Aus dieser Parallelität wird auf einen ursächlichen Zusammenhang geschlossen. Daß Heteroauxinzufuhr Stärkehydrolyse bewirkt, ist schon oft beobachtet worden; neuerdings bewiesen dies z. B. MITCHELL und WHITEHEAD (1940) für Bohnenblätter; auch die Naphthylessigsäure wirkte in gleichem Sinne. Der Schluß LAIBACHS, daß der Wuchsstoff aus Zucker entstehe, erscheint uns indessen nicht gerechtfertigt; die meisten Versuche sprechen eher dafür, daß umgekehrt Wuchsstoff, und zwar wohl indirekt, Stärke hydrolysiert. Wenn Zuckerfütterung zu stärkerer Krümmung Anlaß gibt, so könnte das auch mit der vermutlich erhöhten Atmung zusammenhängen. ZHDANOWA (1939) infiltrierte Blätter von Tabak und *Chrysanthemum* an verdunkelten Pflanzen mit Glukose und untersuchte dann nach 10—15 Tagen den Wuchsstoffgehalt der Sproßspitze. Diese enthielt Wuchsstoff, nicht aber bei Pflanzen, deren Blätter bloß mit Wasser infiltriert worden waren. ZHDANOWA glaubt daher gleichfalls an eine Auxinsynthese auf Kosten zugeleiteten Zuckers. Auch dieser Schluß ist nicht zwingend; Glukosezusatz hebt den Hungerzustand auf, kann also auch indirekt wirken. Denselben Einwand kann man gegen die Versuche von JUHREN und WENT (1949) sowie WENT und CARTER (1948) erheben. Die ersten stellten fest, daß Kürbispflanzen im Dunkeln nicht wachsen und nach wenigen Tagen zugrunde gehen. Injektion von Saccharose dagegen, führt zu Wachstum und längerer Lebensdauer. In der 2. Arbeit wurde ein ähnliches Ergebnis mit Tomaten erzielt. Daß zwischen Zuckergehalt sowie auch Stärkehydrolyse und dem Wuchsstoffgehalt Beziehungen bestehen, steht somit außer Zweifel. Unmittelbare ursächliche Zusammenhänge sind aber nicht erwiesen. Dazu muß schließlich bemerkt werden, daß solche ausschließlich zwischen Zucker und Auxin bestehen könnten, nicht aber beim Heteroauxin, das ja ein Tryptophanabkömmling ist.

Über die Abhängigkeit der Bildung des *Vitamin* B_1 vom Licht liegen besonders Versuche von BONNER und GREEN (1938) vor. Der Kotyledonen beraubte Erbsenkeimlinge gedeihen im Dunkeln viel besser, wenn ihnen Aneurin geboten wird. Werden die Pflanzen ans

Licht gebracht, so steigt der Aneuringehalt rapide an. Danach ist die Bildung dieses Stoffes zweifellos vom Licht abhängig. Damit stimmt überein, daß kultivierte Wurzelspitzen einer Aneurinzufuhr bedürfen, um wachsen zu können. ONDRATSCHEK (1940) fand für Algen eine Abhängigkeit der Aneurinbildung vom Licht.

Die den Zuckern chemisch nahestehende *Ascorbinsäure* findet sich nach Untersuchungen von GIROUD und Mitarbeitern (1934) hauptsächlich in assimilierenden grünen Geweben. Der von MOLISCH (1921) eingeführte Nachweis durch $AgNO_3$-Reduktion ermöglichte es WEBER (1938) als Bildungsort die Chloroplasten wahrscheinlich zu machen. Indessen ist nicht sicher, ob die Reduktion hier wirklich durch die Ascorbinsäure bedingt ist. NEUBAUER (1939) bestätigte in ihrer zusammenfassenden Arbeit die Korrelation von Chlorophyll- und Ascorbinsäuregehalt. Sie findet in Leguminosen-Kotyledonen immer dann einen ansteigenden Vitamin C-Gehalt, wenn die Kohlehydrat- und sonstigen Reserven in erhöhtem Maß beansprucht werden. DISCHENDORFER (1937) hält die Ascorbinsäure für ein Assimilat, RAY (1934) erzielte an isolierten Embryonen Vitamin C-Bildung nach Mannosezusatz. VON HAUSEN (1937) fand, daß kotyledonenlose Erbsenembryonen nur in den ersten Entwicklungsstadien eine Zufuhr von Ascorbinsäure benötigen, sie später aber am Licht selbst bilden können. Nach WEISSENBÖCK (1940) produzieren Keimpflanzen, denen ihre Reservestoffe im Samen oder in den Kotyledonen belassen werden, Ascorbinsäure unabhängig von der Photosynthese; CO_2-frei am Licht gezogene Pflanzen besaßen nämlich keinen geringeren Ascorbinsäuregehalt. Erwachsene Pflanzen, die keine Reserven mehr besitzen, zeigen ohne CO_2 eine Verminderung ihres Ascorbinsäurevorrates. Daraus wird geschlossen, daß die Ascorbinsäurebildung in keiner direkten Beziehung zur Photosynthese steht, wohl aber eine Relation zum Zuckergehalt anzunehmen ist. MOLDTMANN (1939) teilte mit, daß chlorophyllfreie höhere Pflanzen kein Vitamin C besitzen, ferner bestätigte er die Erfahrung, daß Samen zunächst frei davon sind, aber auch im Dunkeln im Verlaufe der Keimung Ascorbinsäure bilden. Die Substanz nimmt mit der Lichtintensität und mit dem assimilatorischen CO_2-Verbrauch zu, bei Monokotylen gehen Glukose- und Ascorbinsäuregehalt parallel. Die Ergebnisse dieses Autors sprechen also im ganzen dafür, daß eine Beziehung zur Photosynthese besteht, aber auch Bildung von Ascorbinsäure aus gespeicherten Zuckern möglich ist.

Überblicken wir die hier kurz angeführte Literatur, so sehen wir, daß über die Beziehungen zwischen Wirkstoffbildung und Licht noch wenig bekannt ist. Was die Wuchsstoffe betrifft, so wurde vor allem bisher nicht zwischen Auxin und Heteroauxin unterschieden, und es ist bei der völligen chemischen Verschiedenheit der beiden Substanzen

nicht nur möglich, sondern sogar sehr wahrscheinlich, daß sie sich gegenüber Licht und Photosynthese verschiedenartig verhalten. Auch die Beziehungen zwischen Licht und der Synthese der Vitamine B_1 und C sind noch unklar.

II. Versuchsergebnisse.

a) Material und Methodik.

In der vorliegenden Arbeit hatten wir uns zunächst die Aufgabe gestellt, zu untersuchen, ob und mit welchen Mitteln Keimpflanzen am Licht ohne CO_2-Zufuhr herangezogen werden können. Es ergab sich, daß dies möglich ist, und daraus resultierte die Notwendigkeit, zu prüfen, ob dabei eine Zunahme an Auxinen, Vitamin B_1 und Ascorbinsäure eintritt. Es war also der Gehalt an solchen Wirkstoffen am Versuchsende festzustellen und mit Kontrollen zu vergleichen. Schon jetzt sei bemerkt, daß sich in solchen Versuchen der Fehler, der durch die Atmungskohlensäure entsteht, nicht vermeiden läßt. Immerhin war zu erwarten, daß zumindest quantitative Unterschiede gegenüber Kontrollen auftreten würden, die eine Entscheidung der Frage ermöglichen, ob Wirkstoffbildung an die Photosynthese gebunden ist oder nicht. Später zu schildernde Beobachtungen sprechen deutlich dafür, daß der durch die Atmungskohlensäure bedingte assimilatorische Gewinn ein sehr geringer ist.

Als Versuchsobjekt diente *Phaseolus vulgaris* Sorte „Holländische Prinzeß". Da es sich um eine Windebohne handelt, wurde meistens die Endknospe entfernt, womit auch das Austreiben mehrerer Seitensprosse erreicht wurde. Da die Kotyledonen nicht nur die Nährstoffe, sondern vermutlich auch einen Großteil der Wirkstoffe enthalten, wurden sie, soweit notwendig, zu Dreiviertel entfernt. Der kleine verbleibende Rest kann keine nennswerte Fehlerquelle darstellen, ermöglicht andererseits ein viel leichteres Arbeiten. Die Aufzucht erfolgte in Blumentöpfen, als Substrat wählten wir in der Regel gereinigten Quarzsand, der zur Auflockerung mit kleinen Ziegelbruchstücken vermischt wurde. Diese kochten wir erst in Salzsäure und wässerten sie dann während 48 Std. Schließlich sterilisierten wir die gefüllten Töpfe bei 150° während 3 Std. Zur Sterilisierung der Bohnen verwendeten wir 70% Alkohol mit anschließender gründlicher Spülung in Aqua dest. Unter diesen Bedingungen traten Infektionen während der Versuchsdauer nicht auf, d. h. es war keine makroskopisch sichtbare Entwicklung von Pilzen oder Bakterien zu beobachten. Die mit den Nährlösungen versorgten Töpfe standen unter Glasglocken, die mit Vaseline fest auf geschliffene Glasplatten aufgesetzt waren. Neben die Töpfe wurden Schälchen mit Bimssteinstückchen, die zur Absorption des CO_2 mit KOH getränkt waren, aufgestellt. Bei diesem Verfahren, das

wir in den ersten Versuchen anwendeten, mußte einmal wöchentlich die Glocke zwecks Nachgießen der Nährlösung abgehoben werden. Um diesen Fehler zu vermeiden, ließen wir uns später Glasglocken mit einer oberen Öffnung anfertigen, die mit einem 2fach durchbohrten Gummistopfen verschlossen war. Durch die eine Öffnung führten wir den Fortsatz eines U-Rohres ein, das mit KOH getränkte Bimssteinstückchen enthielt. Damit war Luftaustausch ohne CO_2-Eintritt und ein Druckausgleich mit der Außenluft erreicht. Durch die 2. Öffnung führte ein mit einem Hahn verschließbarer Scheidetrichter, der so ausgerichtet war, daß durch ihn Nährlösung nachgegossen werden konnte. Überdies stellten wir unter die Glocke noch ein Schälchen mit Kalilauge. Die Aufzucht erfolgte im Gewächshaus bei 20—25°, direktes Sonnenlicht wurde abgeschirmt.

Als Grundnährlösung diente eine KNOPsche Nährlösung + 2% Glukose [Holzzucker der Firma Bergin A.G., Mannheim-Rheinau, der sich in früheren Versuchen (GUTTENBERG und STRUTZ 1952) als wirkstofffrei erwiesen hatte]. An Wirkstoffen kamen zur Verwendung: Heteroauxin 10^{-6} g/cm³, Vitamin B_1 10^{-6} g/cm³ und Vitamin C 10^{-5} g/cm³.

Zur Bestimmung des Gehaltes an Streckungswuchsstoffen verwendeten wir die Extraktionsmethode und den WENTschen *Avena*-Test. Die Trennung von Auxin[1] und Heteroauxin wurde nach der Säure-Laugenmethode sowie mit Hilfe des Erbsenenzyms durchgeführt. Da Heteroauxin bevorzugt in Äther, Auxin aber besser in Alkohol löslich ist, arbeiteten wir mit beiderlei Lösungsmitteln. Für die Ätherextraktion kam peroxydfreier Äther zur Verwendung.

Der Versuchsgang war kurz gesagt folgender. Das Pflanzenmaterial wurde zerkleinert, 10 Std lang mit 10facher Menge Äther unter Zusatz von 5 Tropfen 10% Essigsäure auf je 10 g Material extrahiert, anschließend 1 Std gekocht. Dann wurde das Material filtriert und der Äther des Filtrates auf dem Wasserbad abgedampft. Der Rückstand wird mit 1,5 cm³ Aqua dest. aufgenommen, 0,5 cm³ davon werden mit 0,5 cm³ 3% Agar vermischt. Die Säure-Laugentrennung wurde im wesentlichen nach ERXLEBEN (1935) vorgenommen. Es werden 0,5 cm³ des obengenannten Extraktes mit 5 cm³ n/1HCl, die restlichen 0,5 cm³ mit 5 cm³ n/1NaOH versetzt, beides $3^1/_2$ Std am Rückflußkühler gekocht. Die Neutralisation erfolgt mit gesättigter Natriumbikarbonatlösung oder Weinsäure auf p_H 3,9—4,9 (vgl. REINERT 1950). Die Wuchsstoffe werden aus den Lösungen jeweils 3mal mit 15 cm³ Äther ausgeschüttelt, dieser nach der Trennung abgedampft. Der Rückstand wird mit 0,5 cm³ Aqua dest. aufgenommen und mit 0,5 cm³ 3% Agar vermischt. Getestet wurde erst nach $1^1/_2$—2 Std zwecks gleichmäßiger Verteilung der Wuchsstoffe im Agar (*Avena*-Test).

Der Alkoholextrakt wurde mit 96% Äthylalkohol durchgeführt. Da sich in diesem nach unseren und anderwärtigen Erfahrungen sowohl das saure Auxin als auch neutrale Stoffe sowie Hemmstoffe befinden, wurde eine weitere Trennung

[1] Als Auxin bezeichnen wir den durch Säure und Erbsenenzym unzerstörbaren Wuchsstoff.

vorgenommen. Von der nach dem Verdampfen des Alkohols in 2,5 cm³ Aqua dest. aufgenommenen Rohsubstanz wurden 0,5 cm³ zu Rohtest verwendet. Der Rest wurde auf 20 cm³ mit Aqua dest. aufgefüllt, mit 1,5 cm³ gesättigter $NaHCO_3$-Lösung versetzt und 3mal mit 15 cm³ Äther ausgeschüttelt. Dabei werden die neutralen Stoffe vom Äther aufgenommen. Der neutrale bis schwach alkalische Wasserrest wird nunmehr durch Zusatz von 2,3 cm³ 10% Weinsäure angesäuert und wie früher mit Äther ausgeschüttelt. Diese Fraktion muß die sauren Wuchsstoffe enthalten, die nun wieder durch die Säure-Laugentrennung oder durch das Erbsenenzym differenziert werden können. Bei der Herstellung des Erbsenenzyms, das Heteroauxin in physiologischen Konzentrationen zerstört (TANG und BONNER 1948), hielten wir uns an die Angaben von MOEWUS (1949), so daß sich eine genauere Beschreibung erübrigt. Verwendet wurde die Erbsensorte „Wunder von Weißenfels", die sich bestens bewährte.

Die Aneurinbestimmung erfolgte mit Hilfe des *Phycomyces Blakesleeanus*-Tests (für eine Reinkultur haben wir Prof. Dr. R. HARDER, Göttingen sehr zu danken), und zwar genau nach den Vorschriften von SCHOPFER (1935) und von WITSCH (1948, 1951), so daß die Einzelheiten dort eingesehen werden können. Für die Ascorbinsäurebestimmung verwendeten wir die Methode von TILLMANS (1930), arbeiteten also mit 2,6-Dichlorphenolindophenol. Wir titrierten dabei sowohl auf blauen als auf roten Umschlag, d. h. auf das Natriumsalz und auf die Säure.

b) Über die Entwicklung von Phaseolus-Embryonen am Licht ohne CO_2.

In einer 1. Versuchsreihe wurden 6 Tage lang am Licht in Normalluft gezogene, in Erde getopfte *Phasolus*-Pflanzen 3 Tage ins Dunkelhaus gestellt, um den vorhandenen Wuchsstoff weitgehend zu erschöpfen. Nach 3 Tagen machte sich kein rhythmisches Heben und Senken der Primärblätter mehr bemerkbar. Dieser endogene Rhythmus war also erloschen, was darauf hinweist, daß Wuchsstoffmangel eingetreten war. Denn GUTTENBERG und KRÖPELIN (1948) machten die Beobachtung, daß der Wuchsstoffstrom tagesrhythmisch aus der Lamina in den Blattstiel oder in das Gelenk abfließt und so ursächlich mit der nyktinastischen Bewegung verbunden ist. Diese Beobachtung wurde von BEZLER und BÜNNING (1950) für *Soja* und *Hyoscyamus niger* bestätigt. Entsprechende Zusammenhänge fanden auch LAIBACH und KRIBBEN (1949) an Gurkenkotyledonen.

Unsere im Dunkeln hormonarm gemachten Pflanzen wurden nun im Gewächshaus dem Tageslicht ausgesetzt, und zwar teils unter Glasglocken in CO_2-freier Luft nach Zusatz einer Zuckerlösung, teils als Kontrollen in Normalluft. Vorher wurde der noch wenig entwickelte Sproßteil über den Primärblättern abgeschnitten. Die Primärblätter, die nach 3 Tagen im Dunkeln dauernd gesenkt blieben, hoben sich bei beiden Versuchsserien im Laufe des Tages, was auf Wuchsstoffbildung hinweist. Von nun ab erfolgte die abendliche Senkung der Blätter bei

den ohne CO_2 gezogenen Pflanzen stets $^1/_2$—1 Std früher als bei der Kontrolle. Dies macht es wahrscheinlich, daß bei den letzteren etwas mehr Wuchsstoff gebildet wird. Im ganzen entwickelten sich die mit Zucker versorgten, in CO_2-freier Atmosphäre wachsenen Pflanzen erstaunlich gut, sie verzweigten sich stark, bildeten aber kleinere Blätter als die Kontrollen und gelangten nicht zur vollen Blüte. Die Kontrollpflanzen blühten nach 4 Wochen, während die Pflanzen mit künstlicher Kohlehydratversorgung nach 6 Wochen zwar kleine Blütenknospen angelegt hatten, die aber bald abfielen.

Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Stärkeprobe gemacht, um festzustellen, ob und wie weit die Photosynthese durch den CO_2-Entzug tatsächlich unterbunden war. An einem sonnigen Julitag schnitten wir um 16,00 Uhr einige Blätter der beiden Serien ab. Die Versuchspflanzen ohne CO_2 hatten bedeutend kleinere Spreiten als die Kontrollpflanzen, sie waren hell gelbgrün, durch Alkohol sofort benetzbar und gaben ihr Chlorophyll fast augenblicklich ab; dagegen trat dieser Effekt bei den Normalpflanzen erst langsam beim Erhitzen ein. Zudem waren die Spreiten der letzteren dunkelgrün gefärbt und unterseits schwer benetzbar. Nach der Chlorophyllentziehung wurde als Stärkenachweis die Jodprobe nach SACHS durchgeführt. Die Blätter, die CO_2-Mangel erlitten hatten, färbten sich zunächst bräunlich; standen sie 2 Tage in schwacher Jodlösung am Licht, erschienen sie völlig farblos. Die Normalpflanzen färbten sich, wie zu erwarten war, intensiv schwarzviolett. Die Farbe war nach 2-tägigem Stehen noch vollständig erhalten. Eine mikroskopische Untersuchung ergab, daß bei den CO_2-freien Pflanzen in den Schließzellen der Spaltöffnungen und auch im Assimilationsgewebe nur Spuren von Stärke nachzuweisen sind. Die Pflanzen hatten also nur sehr wenig assimiliert, wenn nicht überhaupt die Stärkespuren auf die Zuckerfütterung zurückzuführen sind.

In allen nun folgenden Versuchen dienten, wie früher angegeben, Ziegelstückchen, vermischt mit Sand, als Substrat. Unter diesen Bedingungen ließ sich der soeben beschriebene Versuch nicht wiederholen, obwohl er in ganz gleicher Weise durchgeführt wurde. Die anfängliche Entwicklung in Normalluft am Licht und die anschließende im Dunkeln ging nicht anders vor sich als bei den in Erde getopften Pflanzen. Sobald die Pflanzen aber, mit Zucker und Nährsalzen versorgt, unter CO_2-Entzug ans Licht gebracht wurden, zeigten sie kein nennenswertes Wachstum mehr.

Bei *Phaseolus*-Pflanzen, die *sofort* am Licht einen CO_2-Entzug ausgesetzt waren und nur Nährlösung und 2% Glukose geboten bekamen, konnte in sehr vielen Parallelversuchen nur ein kümmerliches Wachstum festgestellt werden. Außer kleinen Primärblättern, die schnell gelb wurden und abfielen, entwickelten sich selten noch kleinere Blätter

(Abb. 1, dazu Kontrolle Abb. 2). Wurden die Kotyledonen am Versuchsbeginn zu 75% entfernt, waren die Primärblätter noch bedeutend kleiner, der Stengel dünner und die Pflanzen gingen oft sehr schnell zugrunde. Bei den Kontrollen ließ sich hinsichtlich der Entfernung der Kotyledonen kein Unterschied feststellen. — Dieses ausgesprochen schlechte Wachstum bei alleiniger Zuckerzufuhr in CO_2-armer Atmosphäre wurde bei Zusatz von Wirkstoffen, seltsamerweise der verschiedensten Art, aufgehoben. Zwar wurde nie die Üppigkeit wie bei dem Versuch mit Erde als Substrat erreicht (nach anfänglichem normalen Wachstum im Licht), doch bildeten alle *Phaseolus*-Pflanzen

Abb. 1.

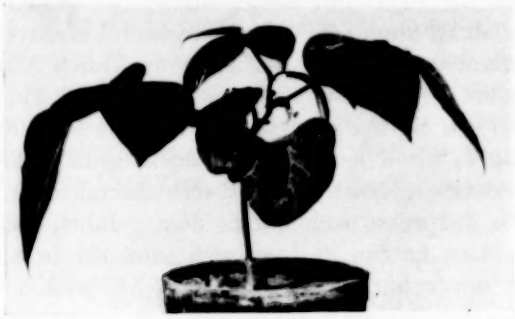


Abb. 2.

Abb. 1. *Phascolus vulgaris*. 4 Wochen alte Pflanze, sofort am Licht ohne CO_2 gezogen. Substrat: Sand + Ziegel, mit Zucker und Nährsalzen versetzt.

Abb. 2. *Phascolus vulgaris*. 4 Wochen alte Kontrollpflanze, sofort am Licht in Normalluft gezogen. Substrat: Sand + Ziegel, nur mit Nährsalzen versetzt.

bei Zusatz der noch zu besprechenden Wirkstoffe mehrere Verzweigungen, Blätter und leicht abfallende Blütenknospen.

Der Zusatz von Heteroauxin 10^{-6} g/cm³, Vitamin B_1 10^{-6}, Vitamin C 10^{-5}, Hefeextrakt (TEMMLER, Berlin-Johannistal), Kombinierung von Heteroauxin und Vitamin B_1 sowie Bohnenextrakt führen annähernd zu demselben Ergebnis (Abb. 3).

Den Bohnenextrakt stellten wir folgendermaßen her: Bohnen der gleichen Sorte wurden 12 Std. eingeweicht und zum Keimen in Petrischalen gelegt. 200 eben gekeimte Bohnen zerkleinerten wir. 100 davon wurden 10 Std. in der Kälte und anschließend 1 Std. durch Äther am Rückflußkühler extrahiert. Die restlichen 100 unterzogen wir einer heißen Alkoholextraktion. Die eingedampften Extrakte wurden kombiniert, in Wasser aufgenommen und einer KNOPschen Nährlösung + Zucker zugesetzt. Dabei wurden verschiedene Verdünnungsstufen hergestellt.

Die 3fache Kombination von Heteroauxin — Vitamin B_1 — Vitamin C führte trotz mehrmals wiederholter Versuche immer zu negativen Ergebnissen, d. h. die Pflanzen gingen in kürzester Zeit

zugrunde. Es könnte sich vielleicht hier um eine zu hohe Konzentration eines der 3 Stoffe handeln.

Die Versuchspflanzen wurden, wie schon erwähnt, wöchentlich mit der entsprechenden Nährlösung begossen. Hierbei zeigte sich, daß sich die weitere Wirkstoffzufuhr verschieden auswirkte. Am besten entwickelten sich zunächst mit Vitamin C versorgte Pflanzen, begannen aber bei mehrmaliger weiterer Zufuhr einzelne Blätter abzuwerfen. Daß es sich hierbei um eine zu hohe Konzentration handelte, zeigte sich an folgendem: Wurde in diesem Zustand nur eine Glukose-Nährlösung ohne Vitamin C verabreicht, hörte der Blattfall auf; bei erneuter Vitamin C-Zufuhr trat er wieder ein. Die mit Vitamin B_1 versorgten Pflanzen steigerten innerhalb bestimmter Grenzen ihr Wachstum etwa proportional der weiteren Zufuhr. Auch weitere Heteroauxinzufuhr hatte günstigen Erfolg.

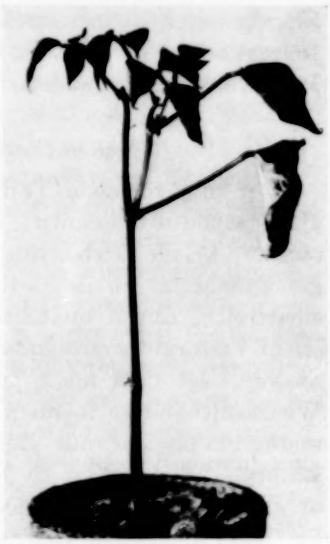


Abb. 3. *Phaseolus vulgaris*. 5 Wochen alte Pflanzen, sofort am Licht ohne CO_2 gezogen. Substrat: Sand + Ziegel, mit Zucker, Nährsalzen und Hefeextrakt versetzt. Pflanzen mit Zusatz von Heteroauxin, Vitamin B_1, Vitamin C oder Bohnenextrakt zeigen keine nennenswerten Unterschiede.

Dies Ergebnis scheint darauf schließen zu lassen, daß verschiedene Wirkstoffe sich ersetzen können oder die Darbietung eines Stoffes die Produktion eines anderen unbedingt erforderlichen anregt.

Entsprechende Beobachtungen machte Künning (1950) bei *Phaseolus multiflorus*. Er zeigte in Versuchen mit im Epikotyl dekapitierten und an der Schnittfläche mit Wirkstoffpasten versehenen Keimlingen, daß auch Aneurin und Ascorbinsäure Kambiumtätigkeit hervorrufen können, und zwar scheinen diese Stoffe nicht weniger wirksam als Heteroauxin selbst zu sein. Gustafson (1939) erhielt durch Behandlung mit Phenylessigsäure bei der Tomate parthenocarpe Früchte. Phenylessigsäure verhält sich zwar wie ein Wuchsstoff, gibt aber im *Avena*-Test keine Krümmungen. Die parthenokarpen Früchte enthielten aber einen Wuchsstoff, der sich im *Avena*-Test nachweisen ließ. Der Zusatz von Phenylessigsäure hatte also die Fruchtknoten angeregt, selbst einen normalen Wuchsstoff zu bilden.

Wie schon erwähnt, ergab sich in unseren Versuchen, daß die 2% reinste Glukose, die bei Wirkstoffzusatz eine günstige Konzentration darstellt, allein geboten, einen hemmenden Einfluß auf die Bohnen ausübt. Dieser Effekt zeigte sich auch bei normalen Kontrollpflanzen

mit Assimilationsmöglichkeit. Die mit Zuckerlösung begossenen Pflanzen weisen in der Jugend viel kleinere Primärblätter und schmächtigere Achsen auf; später zeigen sie einen gedrungeneren Wuchs und kleinere Blattspreiten. Daß in unseren Versuchen Kultur in Erde bei Zuckerzusatz günstig wirkt, dürfte darauf zurückzuführen sein, daß diese Wirkstoffe, darunter vermutlich auch Heteroauxin, enthält.

Zur weiteren Kontrolle wurden Pflanzen auch etioliert im Sand-Ziegelgemisch (ohne Zucker) gezogen. Nach 4 Wochen waren ihre Achsen sehr gestreckt, die Kotyledonen abgefallen und lediglich kleine Primärblätter vorhanden.

c) Quantitative Bestimmung der Wirkstoffe.

Der nun folgende Teil der Untersuchung beschäftigt sich in der Hauptsache mit quantitativen Bestimmungen von Wuchs- und Wirkstoffen. Da die Darbietung verschiedener solcher Wirkstoffe bei *Phaseolus* annähernd zu demselben Ergebnis geführt hatte, schien es aussichtsreich, durch quantitative Bestimmungen festzustellen, ob vielleicht Versorgung mit einem der Wirkstoffe die Produktion eines anderen auslöse. Ist dem nicht so, muß angenommen werden, daß einzelne Wirkstoffe andere in ihrer Funktion ersetzen können. Die Aufzuchtmethodik stimmt mit der früher beschriebenen überein. Um dem Embryo die Reserven an Nähr- und Wirkstoffen zu entziehen, wurden in allen Fällen die Kotyledonen nur auf $^1/_4$ belassen. Dagegen wurde die Endspitze nicht entfernt, da sie für die Neubildung von Wuchsstoffen von Bedeutung ist. Aus ihr lassen sich vielfach große Wuchsstoffmengen gewinnen, wie z. B. Thimann und Skoog (1934) bei *Vicia Faba*, Overbeek (1938) bei *Pisum* und Stewart (1940) bei *Phaseolus* zeigten. Unsere Pflanzen wurden in allen Serien nach 14tägigem Wachstum verarbeitet.

1. Nachweis von Auxin und Heteroauxin. Bei der Bestimmung der Wuchsstoffe mußte darauf geachtet werden, daß mit 2 solchen, nämlich Heteroauxin und Auxin zu rechnen ist. Manche Autoren betrachten heute die Indolylessigsäure als den maßgeblichen pflanzlichen Wuchsstoff, so besonders Wildman und Bonner (1948) und Reinert (1950), jedoch gelang es v. Guttenberg und Mitarbeitern, wiederholt säurefeste und erbsenenzymbeständige Wuchsstoffe, also wohl Auxin, neben Heteroauxin nachzuweisen. Auch Avery, Berger und White (1945) konnten aus Kohl neben dem laugenfesten einen säurefesten Wuchsstoff extrahieren.

Da Auxin und Heteroauxin trotz völliger chemischer Verschiedenheit eine gleichartige Wirkung haben, sprach v. Guttenberg im Jahre 1942 Heteroauxin als Auxinaktivator an; es wirke nicht direkt, sondern

diene zur Mobilisierung des letzteren. Eine Reihe von Versuchen stützen diese Hypothese. So zeigten Dettweiler (1943), v. Guttenberg und Eifler, v. Guttenberg und Feldmeier, v. Guttenberg und Nehring (noch unveröffentlicht), daß nach der Behandlung mit Heteroauxinpasten oder -lösungen ein säure- und erbsenenzymfester Wuchstoff auftritt.

Die Aufzucht- und Extraktionsmethoden wurden schon früher besprochen; es können also hier gleich die Ergebnisse mitgeteilt werden. Diese sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt. Der Übersicht wegen vergleichen wir am besten die verschiedenen Extrakte und Fraktionen der einzelnen Versuchsserien miteinander. Als Kontrollen dienten einerseits etiolierte, andererseits am Licht in Normalluft gezogene Pflanzen. Alle anderen Pflanzen wuchsen ohne CO_2-Zufuhr am Licht. An Wirkstoffen wurden hier die Vitamine B_1 und C zugesetzt, um festzustellen, ob ihre Anwesenheit den Gehalt an Wuchsstoffen erhöht. Die Säure-Laugezerstörung und die Behandlung mit Erbsenenzym sollten erweisen, welcher Wuchsstoff vorliegt. Eine Serie wurde mit Heteroauxin versorgt, um nochmals zu prüfen, ob dadurch eine Produktion von Auxin a (säure- und enzymfester Wuchsstoff) bewirkt wird. Schließlich sollte auch der Wuchsstoffgehalt von Pflanzen untersucht werden, die, nur mit Zucker versorgt, ohne CO_2 am Licht gezogen wurden.

Die Krümmungswinkel des *Ätherrohextraktes* in Tabelle 1 und 2 sind, außer einer geringen Verminderung bei den etiolierten und mit Vitamin B_1 versorgten Pflanzen, als ziemlich gleichwertig zu betrachten.

Tabelle 1. *Phaseolus vulgaris. Nachweis des Auxin- und Heteroauxingehaltes im Avena-Test.*

1. Trennung von Auxin und Heteroauxin aus Ätherextrakt durch Kochen mit NaOH oder HCl.

	Ätherrohextrakt	Ätherrohextrakt, NaOH-Behandlung	Ätherrohextrakt, HCl-Behandlung
Etiolierte Kontrollpflanzen, + CO_2 6 Pfl., 6,5 g	14° ± 1,01	17° ± 1,89	± 0
Kontrollpflanzen am Licht, + CO_2 7 Pfl., 7,4 g	18° ± 0,27	19° ± 1,44	± 0
Zusatz von Vitamin B_1 + Zucker, — CO_2 5 Pfl., 4,5 g	15° ± 1,20	21° ± 1,56	± 0
Zusatz von Zucker, — CO_2 5 Pfl., 4,0 g	19° ± 1,94	18° ± 1,19	± 0
Zusatz von Zucker, — CO_2 5 Pfl., 3 g	16° ± 1,0	14° ± 2,45	± 0
Zusatz von Zucker und Vitamin C, — CO_2 5 Pfl., 4,0 g	19° ± 0,26	8° ± 1,81	12° ± 1,13

Tabelle 2. *Phaseolus vulgaris. Nachweis des Auxin- und Heteroauxingehaltes im Avena-Test.*
2. Zerstörung des Heteroauxins aus Ätherextrakt durch Erbsenenzym.

Datum		Ätherrohextrakt	Ätherextrakt, saure Phase	Ätherextrakt, saure Phase, Behandlung mit Erbsenenzym
4. 4. 52	Etiolierte Pflanzen, + CO_2 6 Pfl., 4 g	14° ± 1,01	17° ± 1,06	± 0
6. 4. 52	Kontrollpflanzen, + CO_2 5 Pfl., 9,6 g	18° ± 0,27	16° ± 1,21	± 0
4. 4. 52	Zusatz von Zucker und Vitamin B_1, — CO_2 4 Pfl., 5,2 g	15° ± 0,10	16° ± 1,14	± 0
5. 4. 52	Zusatz von Zucker und HA, — CO_2 5 Pfl., 4,0 g	18° ± 1,33	18° ± 1,43	15° ± 1,13
6. 4. 52	Zusatz von Zucker und Vitamin C, — CO_2 5 Pfl., 4,0 g	19° ± 0,24	21° ± 1,97	20° ± 1,3
	Bohnensamen, 5 Stück, je $^3/_4$ der Kotyledonen abgeschnitten		7° ± 1,41	

Eine nach Abtrennung der Neutralstoffe durchgeführte saure Ausschüttelung mit Äther (Tabelle 2), ergibt im allgemeinen keine Steigerung der Werte mehr, ein Zeichen, daß der mit einigen Tropfen Essigsäure versetzte Ätherrohextrakt nur Wuchsstoffe enthält. Eine Ausnahme machen die etiolierten Pflanzen. Hier steigt der an sich niedere Wert nicht unbeträchtlich an, was vielleicht auf einen Hemmstoff oder inaktiven Wuchsstoff im Rohextrakt hinweist. Um eine Entscheidung fällen zu können, welcher Wuchsstoff hier wirksam ist, wurde die Ätherfraktion nach Überführung in Wasser mit Säure bzw. Lauge gekocht.

Wie schon erwähnt, wird Heteroauxin durch Säure zerstört, dagegen ist es laugenfest. Die Tabelle 1 zeigt uns, daß im Ätherextrakt von grünen und etiolierten Kontrollpflanzen, mit B_1 versorgten und reinen Zuckerpflanzen ausschließlich laugenfester Wuchsstoff vorliegt, der durch Säure zerstört wird, also dem Heteroauxin entspricht. Dieses ist also besonders ätherlöslich. Bei Vitamin B_1- und etiolierten Pflanzen ist eine Erhöhung des Wuchstoffwertes nach Laugenzerstörung gegenüber dem Rohextrakt festzustellen. Wieder wird man an eine Ausscheidung von Hemmstoffen oder Aktivierung eines Wirkstoffes infolge der Laugenbehandlung denken. Mit Vitamin C versorgte Pflanzen weisen nur einen geringen Betrag des laugenfesten Wuchsstoffes auf, dagegen einen beachtlichen Betrag eines säurefesten und durch Lauge zerstörbaren Stoffes.

Wurde die saure Phase des Ätherextraktes mit *Erbsenenzym* behandelt (Tabelle 2), so zeigte sich wieder, daß der Wuchsstoff der Lichtkontrolle, der etiolierten und B_1-Pflanzen Heteroauxin ist, da völlige Zerstörung eintrat. Bei mit Vitamin C versorgten Pflanzen blieb in diesem Falle sogar die volle Wirksamkeit der sauren Phase erhalten. Der Zusatz von Heteroauxin zeigt dasselbe Ergebnis, auch hier ist fast nur enzymfester Stoff, also wohl Auxin a vorhanden. *Daraus ergibt sich ein neuer Beweis für die 1942 von* v. GUTTENBERG *aufgestellte Hypothese der Aktivierung des Auxins durch Heteroauxin.* Darbietung von Heteroauxin in der Nährlösung bewirkt das Auftreten eines enzymfesten und HCl-beständigen Wuchsstoffes. Hinzu kommt die neue Tatsache, daß auch eine Vitamin C-Zufuhr, zunächst allerdings nur in CO_2-freier Atmosphäre erprobt, einen derartigen Effekt zur Folge hat. Die Ascorbinsäure muß also als Redoxsubstanz bei der Auxinbildung oder Aktivierung eine erhebliche Rolle spielen, wenigstens dann, wenn die Möglichkeit der Assimilation nicht besteht[1].

Der *Alkoholextrakt* (Tabelle 3 und 4) weist bei der Kontrolle und den nur mit Zucker begossenen CO_2-freien Pflanzen im *Avena*-Test sehr kleine Werte auf. Die etiolierten und Heteroauxinpflanzen ergeben die gleichen Winkel wie beim Ätherextrakt, Vitamin B_1- und Vitamin C-Pflanzen etwas geringere. Nach Abtrennung der neutralen Phase steigt in der sauren Fraktion bei Lichtkontrollen der Wert sehr an; es scheint also ein Hemmstoff die Wuchsstoffwirkung im Rohtest teilweise zu kompensieren oder es liegt eine Vorstufe (eventuell inaktive Form) des Wuchsstoffes vor, die durch die Säure aktiviert wird. Da also der vermehrte Wuchsstoff nicht Heteroauxin, sondern Auxin ist, scheidet die Annahme, daß es sich um Indolacetaldehyd handelt (LARSEN 1944), aus. Es muß ein Stoff vorliegen, aus dem Auxin entstehen kann.

Die *Erbsenenzymbehandlung* (Tabelle 4) zeigt, daß die Kontroll- und Heteroauxinpflanzen, wie auch wieder die Vitamin C-Pflanzen fast nur Auxin besitzen, während Etiolement, B_1 oder alleiniger Glukosezusatz (bei diesem durch Säure-Laugenzerstörung nachgewiesen, Tabelle 4) ohne CO_2-Zufuhr keine Auxinbildung ermöglichen. Bei mit Heteroauxin und Vitamin C versorgten Pflanzen entspricht dies durchaus dem Ergebnis der Ätherextraktion. Die Kontrollpflanzen hingegen gaben an den Äther nur Heteroauxin ab, während im Alkohol fast ausschließlich Auxin erscheint. Unter normalen Bedingungen wachsende Pflanzen

[1] Nach Abschluß des Manuskriptes erschien eine Arbeit von SCHEUERMANN [Planta (Berl.) **40**, 256 (1952)] in der gezeigt wird, daß Ascorbinsäure zusammen mit Tryptophan, im Zylindertest geboten, erhöhtes Wachstum bewirkt. Die Wirkung wird darauf zurückgeführt, daß Vitamin C aus Tryptophan durch oxydative Desaminierung Heteroauxin erzeugt. Dessen Zunahme wurde indessen nicht in den Pflanzen selbst nachgewiesen. Nach unseren Versuchen käme es wieder nur als Auxinaktivator in Frage.

Tabelle 3. *Phaseolus vulgaris. Nachweis der Wuchsstoffe des Alkoholextraktes im Avena-Test.*

Datum		Alkohol-rohextrakt	Alkoholextrakt, saure Phase
4. 12. 51	Etiolierte Pflanzen, + CO_2 6 Pfl., 7 g	14° ± 2,92	17° ± 3,46
5. 12. 51	Kontrollpflanzen, + CO_2 7 Pfl., 7,6 g	6° ± 1,21	25° ± 5,19
6. 12. 51	Zusatz von Vitamin B_1 und Zucker, — CO_2 5 Pfl., 4,5 g	13° ± 1,21	17° ± 0,3
8. 12. 51	Zusatz von Zucker, — CO_2 5 Pfl., 4,0 g	8° ± 1,23	15° ± 1,10
7. 6. 52	Zusatz von Zucker, — CO_2 5 Pfl., 3,2 g	6° ± 1,11	11° ± 0,11
5. 11. 51	Zusatz von Zucker und Vitamin C, — CO_2 5 Pfl., 4,5 g	12° ± 0,18	15° ± 1,10

Tabelle 4. *Phaseolus vulgaris. Nachweis des Auxin- und Heteroauxingehaltes im Avena-Test.*
Zerstörung des Heteroauxins im Alkoholextrakt durch Erbsenenzym.

Datum		Alkohol-rohextrakt	Alkohol-extrakt, saure Phase	Alkohol-extrakt, saure Phase, behandelt mit Erbsenenzym
4. 4. 52	Etiolierte Pflanzen, + CO_2 7 Pfl., 5,9 g	14° ± 1,08	14° ± 1,21	± 0
6. 4. 52	Kontrollpflanzen, + CO_2 5 Pfl., 10,5 g	12° ± 0,23	20° ± 2,4	18° ± 1,21
4. 4. 52	Zusatz von Zucker und Vitamin B_1, — CO_2 4 Pfl., 6 g	13° ± 1,21	14° ± 1,28	± 0
5. 4. 52	Zusatz von Zucker und HA, — CO_2 5 Pfl., 4,1 g	17° ± 0,11	20° ± 1,17	20° ± 1,82
6. 4. 52	Zusatz von Zucker und Vitamin C, — CO_2 5 Pfl., 4,5 g	16° ± 0,30	17° ± 0,88	18° ± 2,31
7. 6. 52	Zusatz von Zucker, — CO_2 5 Pfl., 3,2 g	6° ± 1,11	11° ± 0,11	NaOH HCl 8° ± 1,52; ± 0
	Bohnensamen, 5 Stück, je $^3/_4$ der Kotyledonen abgeschnitten		6,2° ± 1,41	

besitzen also beiderlei Wuchsstoffe, mit Heteroauxin und Vitamin C versorgte Pflanzen am Licht fast ausschließlich Auxin, etiolierte sowie mit Vitamin B_1 oder bloßem Zucker versehene Pflanzen nur Heteroauxin.

Die Extraktion von Embryonen samt dem restlichen $^1/_4$ der Kotyledonen ergab nur eine geringe Menge an Wuchsstoffen (Tabelle 2 und 4). Demzufolge ist eine *Heteroauxinsynthese* bei dargebotener Glukose am Licht ohne CO_2 möglich; sie vollzieht sich aber, wie die etiolierten Pflanzen beweisen, bei Zuckerzufuhr auch im Dunkeln, wenn auch in etwas verringertem Ausmaße; die Krümmungswinkel waren hier deutlich kleiner. Das hier nicht entfernte CO_2 konnte im Dunkeln keine Rolle spielen. Somit bleibt die Zuckerzufuhr der alleinige wirksame Faktor für diese Synthese. Die *Auxinsynthese* muß lichtabhängig sein, da sie bei im Dunkeln gezogenen Keimpflanzen nicht auftritt. Von der photosynthetischen Zuckervermehrung ist sie offenbar unabhängig, da zugeführter Zucker am Licht ohne CO_2 keine Auxinbildung bewirkt. Diese tritt hier erst auf, wenn Heteroauxin zugesetzt wird. Wenn normale Kontrollpflanzen beiderlei Wuchsstoffe besitzen, so ist das also wohl so zu verstehen, daß die Photosynthese einen Zustand schafft, der bei Anwesenheit von Heteroauxin die Auxinbildung ermöglicht. Ohne Photosynthese kann diese nur bei künstlich erhöhtem Heteroauxingehalt vor sich gehen. Die Tatsache, daß auch Vitamin C Auxinbildung bewirkt, könnte so gedeutet werden, daß es erst Heteroauxin aktiviert und so indirekt die Auxinbildung anregt. Doch zeigte sich, daß Heteroauxin bei Vitamin C-Zusatz, wenn überhaupt, nur in geringster Menge vorhanden ist. Viel eher wird man annehmen müssen, daß die Auxinbildung das Auftreten von Heteroauxin zurückdrängt. Nur so ist es nämlich zu erklären, daß auch bei Heteroauxinzufuhr nicht dieses, sondern das enzymfeste Auxin erscheint. Da die Ascorbinsäure nur in ihrer reduzierten Form wirkt, dürfte sie als Redoxsubstanz die Aktivierung des Auxins herbeiführen.

2. Nachweis von Vitamin B_1. Die Tatsache, daß CO_2-frei am Licht mit Zuckernährlösung gezogene Pflanzen in fast gleicher Weise durch Heteroauxin, Vitamin B_1 und Vitamin C zur Entwicklung angeregt werden, legt, wie schon erwähnt wurde, den Gedanken nahe, daß der Zusatz eines dieser Stoffe die Bildung des anderen auslöst. Zur Klärung dieser Frage wurden der Gehalt an Vitamin B_1 und C in den Pflanzen der verschiedenen Versuchsserien geprüft. Hierfür stehen geeignete Teste zur Verfügung. Was das Heteroauxin betrifft, so zeigen die Tabellen 1 und 4, daß Vitamin C zwar das Auxin, nicht aber das Heteroauxin anreichert und Vitamin B_1 den Heteroauxingehalt nicht erhöht. Für das Vitamin C kann somit gesagt werden, daß der oben angedeutete Gedanke zutrifft.

In Tabelle 6 wird der relative Aneuringehalt unserer Versuchsserien von *Phaseolus vulgaris*, gemessen am Mycelgewicht von *Phycomyces*, angegeben. Zunächst seien aber die Mycelgewichte unserer Vitaminkontrollen mitgeteilt (Tabelle 5). 20 cm^3 der Stammlösung

Tabelle 5. *Phycomyces Blakesleeanus. Mycelgewichte der Vitaminkontrolle.*

	Vitamin-Stammlösung 16 γ auf 100 cm³						
	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	V_6	V_7
Milligramm je Kolben	9,7	45,2	55,4	60,4	43,1	27,0	24,8
	9,9	45,9	56,0	60,1	44,0	27,5	25,2
	9,6	44,9	55,5	59,8	43,8	27,8	25,0
	9,9	45,3	55,1		43,8	28,0	25,1
Durchschnittswert	9,75	45,3	55,4	60,1	43,8	27,75	25,02

Tabelle 6. *Phaseolus vulgaris. Mycelgewichte im Phycomyces-Test.* Alter der Pflanzen: 14 Tage.

	$^1/_1$	$^1/_2$	$^1/_1$	$^1/_2$
a) Kontrolle + CO_2 4 Pflanzen, 4,3 g			b) Etiolierte Pflanzen + CO_2 4 Pflanzen, 2,6 g	
Milligramm je Kolben	79,9	67,0	63,8	44,9
	79,9	67,1	62,7	45,0
	79,7	66,9	62,6	45,2
			63,1	
Durchschnitt	79,8	67,0	62,05	45,03
c) Zusatz von HA und Glukose, — CO_2 4 Pflanzen, 2,5 g			d) Zusatz von Vitamin C und Glukose, — CO_2 4 Pflanzen, 2,9 g	
Milligramm je Kolben	67,1	49,1	70,2	58,1
	66,9	48,4	70,8	60,0
	67,1	48,7	71,1	60,1
	66,8	48,9	71,2	59,7
Durchschnitt	66,3	48,8	70,8	59,47
e) Zusatz von Vitamin B_1 und Glukose, — CO_2 4 Pflanzen, 3,0 g			f) Zusatz von Glukose, — CO_2 4 Pflanzen, 2,4 g	
Milligramm je Kolben	85,1	70,0	66,5	48,2
	85,0	69,5	66,6	47,9
	84,2	69,4	66,0	47,8
	84,9	69,8	65,6	48,3
Durchschnitt	84,8	69,65	66,17	48,05

(16 γ auf 100 cm³ = $1{,}6 \times 10^{-9}$ g/cm³ = V_1) zeigen infolge zu hoher Konzentration eine Hemmung, je Kolben werden nur 9,75 mg Mycel gebildet. Daher wurden Verdünnungsstufen im Verhältnis $^1/_4$, $^1/_8$, $^1/_{16}$ usw. hergestellt (V_2, V_3, V_4 usw.). Die erste Verdünnung auf die Hälfte (V_2) läßt die Mycelentwicklung stark ansteigen; dieser Anstieg setzt sich dann sukzessive fort und erreicht in der Verdünnungsstufe V_4, d. i. $^1/_{16}$, das Maximum mit einem Gewicht von 60,1 mg. Bei weiterer Verdünnung folgt wieder ein langsamer Abfall.

Die höchsten Aneurinwerte der *Phaseolus*-Pflanzen, gemessen am Mycelgewicht, übertreffen alle den maximalen Kontrollwert (Ta-

belle 5, V_4). Obwohl die Versuche aus diesem Grunde noch einmal mit größter Genauigkeit wiederholt wurden, konnte nur das schon vorliegende Ergebnis bestätigt werden. Der Extrakt dürfte daher optimale Konzentrationen von Spurenelementen oder Spuren anderer Wirkstoffe enthalten, die das Mycelwachstum des *Phycomyces Blakesleeanus* zusätzlich günstig beeinflussen. Wir möchten aus diesem Grunde, um Ungenauigkeiten zu vermeiden, keine Umrechnung des Aneuringehaltes in γ je Gramm Pflanzenmaterial vornehmen, besonders da die Bildung von Milligramm Mycel je Pflanze eine gute Vergleichsmöglichkeit bietet, und es uns nur hierauf ankommt.

Da jeweils 4 Pflanzen das Ausgangsmaterial bilden und in allen Serien 4 Versuche angesetzt wurden, entsprechen unsere Durchschnittswerte etwa dem Gehalt einer Pflanze. In allen Fällen weist der unverdünnte Extrakt die höchsten Aneurinwerte auf, während mit steigender Verdünnung ein Gewichtsabfall der Mycele eintritt, so daß wir uns nur mit den ersten Werten beschäftigen wollen.

Der niedrigste Aneuringehalt wird durch Dunkelkultur verursacht, (Mycelgewicht 62,05 mg). Der Zusatz von Zucker oder Zucker + Heteroauxin am Licht hat bei fehlender Assimilationsmöglichkeit kaum eine Steigerung zur Folge (66,17 mg und 66,3 mg). Eine etwas fördernde Wirkung in der Aneurinsynthese, wenn auch nicht ganz den Kontrollwert (79,8 mg) erreichend, bewirkt dagegen der Zusatz von Vitamin C (70,8 mg). So scheint auch bei der Vitamin B_1-Synthese die Redoxfähigkeit der Ascorbinsäure nicht unwichtig zu sein. Lag bis jetzt der Aneuringehalt der Kontrollpflanzen, die am Licht an CO_2-haltiger Luft gewachsen waren, am höchsten, so wurde dieser stark von dem mit Vitamin B_1 versorgten Pflanzen übertroffen (84,8 mg). Die starke B_1-Anhäufung und andererseits die mäßige Zunahme an Heteroauxin (Tabelle 1) sowie das Fehlen des enzymfesten und HCl-beständigen Wuchsstoffes Auxin (Tabelle 2) bei B_1-Zusatz läßt bei demselben Erfolg — es waren ja alle Pflanzen trotz der verschiedenen Wirk- und Wuchsstoffzusätze gleich gut entwickelt — darauf schließen, daß Aneurin die Streckungswuchsstoffe weitgehend ersetzen kann.

3. Nachweis von Vitamin C. Tabelle 7 zeigt den Vitamin C-Gehalt der verschiedenen Serien von *Phaseolus*-Pflanzen. In der Literatur wurde bisher der Gehalt an Ascorbinsäure durchweg auf 1 g Frischgewicht bezogen; wir möchten ihn indessen vor allem je Pflanze berechnen. Denn das Gewicht der Kontrollen, der etiolierten und der mit verschiedenen Zusätzen bezogenen Pflanzen variiert sehr; dieser Gewichtsunterschied ist aber, besonders bei den CO_2-freien Pflanzen, fast ausschließlich auf die verschieden lange und starke Ausbildung des Hypokotyls und Epikotyls zurückzuführen, dagegen sind die jungen Blätter

Tabelle 7. *Bestimmung des Ascorbinsäuregehaltes* (*Titration nach* TILLMANS). Ausgangsmenge 100 cm³ Extrakt, davon je 50 cm³ bei p_H 3 und p_H 5 titriert.

Alter der Pflanzen 14 Tage.

	Kontrolle + CO_2 12 Pflanzen, 12,0 g mg	Etiolierte Pflanzen + CO_2 12Pflanzen, 8,2 g mg	Zusatz von HA + Zucker,−CO_2 12 Pflanzen, 8,9 g mg	Zusatz von Vitamin B_1 + Zucker,−CO_2 12 Pflanzen, 9 g mg	Zusatz von Vitamin C + Zucker, CO_2 12 Pflanzen, 6,8 g mg	Zusatz von Zucker,−CO_2 12 Pflanzen, 5,8 g mg
$p_H = 3$ rot	0,380	0,149	0,247	0,247	0,294	0,207
$p_H = 5$ blau	0,381	0,149	0,237	0,237	0,285	0,208
Milligramm Ascorbinsäure je 1 g Material	$6{,}3 \cdot 10^{-2}$	$3{,}6 \cdot 10^{-2}$	$5{,}4 \cdot 10^{-2}$	$5{,}4 \cdot 10^{-2}$	$8{,}5 \cdot 10^{-2}$	$7{,}1 \cdot 10^{-2}$
Milligramm Ascorbinsäure je Pflanze	$6{,}3 \cdot 10^{-2}$	$2{,}4 \cdot 10^{-2}$	$4{,}0 \cdot 10^{-2}$	$4{,}0 \cdot 10^{-2}$	$4{,}8 \cdot 10^{-2}$	$3{,}5 \cdot 10^{-2}$

und Knospen die Hauptvitaminquellen. Die Mengen je Gramm Pflanzenmaterial sind indessen in der Tabelle auch aufgeführt.

Etiolierte *Phaseolus*-Pflanzen weisen je Pflanze einen weit geringeren Gehalt an Ascorbinsäure auf, als die Lichtkontrolle. Der Zusatz von Zucker bei CO_2-Entzug zeigt einen Anstieg, erreicht aber nur etwas mehr als die Hälfte des Kontrollwertes. Bei Zufuhr von Heteroauxin und Vitamin B_1 übertrifft die Vitaminmenge zwar den Wert bei Zuckerzusatz, erreicht aber auch den Vitamin C-Gehalt der Kontrolle nicht. Überraschenderweise bewirkt die künstliche Ascorbinsäurezufuhr keinen sehr großen Anstieg, je Pflanze berechnet. Da nun Ascorbinsäure die Bildung eines säure- und enzymfesten Wuchsstoffes bei CO_2-freien Pflanzen sehr anregt, scheint die aufgenommene Zusatzmenge nicht gespeichert, sondern sogleich für andere Prozesse verbraucht (oxydiert) zu werden. Konnten K. und M. WEISSENBÖCK (1940) für Embryonen von *Vicia Faba*, die der Kotyledonen beraubt waren, eine weitgehende Unabhängigkeit der Vitamin C-Bildung von der Photosynthese zeigen, so sprechen unsere Versuche, in welchen *Phaseolus vulgaris*-Keimpflanzen bei weitgehender Fortnahme der Reservestoffquellen in CO_2-freier Luft gezogen wurden, für eine gewisse Abhängigkeit von der Photosynthese. Der Wert der belichteten Kontrollpflanzen liegt deutlich am höchsten. Die Erhöhung des Vitamin C-Gehaltes der CO_2-freien Pflanzen bei Zuckerzufuhr, mit und ohne Wirkstoffzusatz, gegenüber den etiolierten, deutet andererseits auch darauf hin, daß die Möglichkeit der Synthese aus dargebotenem Zucker im Licht besteht, jedoch wohl nur innerhalb bestimmter Grenzen. Bei Berechnung auf 1 g Pflanzensubstanz verschiebt sich das Bild nicht unwesentlich. Die realtiv kleinen Vitamin C-Pflanzen zeigen eine deutliche Anhäufung des

Vitamins, ebenso die noch kleineren Zuckerpflanzen. Dies dürfte damit zu erklären sein, daß die aufgenommene oder neugebildete Ascorbinsäure infolge geringeren Wachstums nur zum Teil beansprucht wird.

4. Die Vermehrung der Spaltöffnungen bei CO_2-freier Kultur. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, daß bei den CO_2-frei gezogenen Pflanzen Anomalien bei der Bildung der Spaltöffnungen auftreten. Vor allem ist ihre Anzahl gegenüber Kontrollen bedeutend vermehrt, teilweise über das Doppelte. Ferner wird eine beträchtliche Anzahl kleinerer Spaltöffnungen entwickelt. Diese sind deutlich von normalen Stomata zu unterscheiden und nicht durch Übergänge mit ihnen verbunden; ihre Durchmesser in der Längs- und Querrichtung betragen etwa die Hälfte der normalen.

In Tabelle 8 sind die Zählungsergebnisse für je ein Gesichtsfeld aller untersuchten Versuchsserien eingetragen. Die Zählung der Spaltöffnungen bei den Kontrollpflanzen und denen, die nach anfänglichem 6tägigem normalen Wachstum Zuckerzusatz bei CO_2-Entzug erhielten, wurde an Folgeblättern durchgeführt, die im August 1951 gewachsen waren. Die Zahlen der anderen Spalten treffen für im Januar gewachsene Pflanzen zu, die bei zusätzlicher künstlicher Beleuchtung im Gewächshaus standen. Dieser jahreszeitliche und Beleuchtungsunterschied könnte für die Differenz der Spaltöffnungszahlen verantwortlich sein. Da aber

Tabelle 8. *Anzahl der Spaltöffnungen.*
Die Anzahl der Spaltöffnungen bezieht sich auf ein Mikroskopgesichtsfeld bei einer 40fachen Objektiv- und einer 10fachen Okularvergrößerung.

	Kontrollpflanzen	Zusatz von Zucker ohne CO_2, zunächst 6 Tage mit CO_2 gewachsen, in Erde	Zusatz von Zucker und Heteroauxin ohne CO_2, Substrat: Steine und Sand
1. Zählung, große Spaltöffnung	23	42	55
1. Zählung, kleine Spaltöffnung	3	16	26
2. Zählung, große Spaltöffnung	25	36	54
2. Zählung, kleine Spaltöffnung	2	14	21
3. Zählung, große Spaltöffnung	24	41	54
3. Zählung, kleine Spaltöffnung	1	15	24

	Zusatz von Zucker und Vitamin B_1 ohne CO_2, Substrat: Steine und Sand	Zusatz von Zucker und Vitamin C, ohne CO_2, Substrat: Steine und Sand	Zusatz von Zucker, ohne CO_2, Substrat: Steine und Sand
1. Zählung, große Spaltöffnung	55	40	48
1. Zählung, kleine Spaltöffnung	22	18	14
2. Zählung, große Spaltöffnung	56	42	50
2. Zählung, kleine Spaltöffnung	23	16	15
3. Zählung, große Spaltöffnung	54	40	48
3. Zählung, kleine Spaltöffnung	21	15	15

auch die gleichzeitig im August gezogenen Serien einen typischen Unterschied zeigen, muß die entscheidende Ursache eine andere sein, und zwar der bei allen Serien (bis auf die Kontrollen) durchgeführte Kohlensäureentzug. Um den Zusatz von Zucker kann es sich deshalb kaum handeln, weil solcher bei den Kontrollen durch Photosynthese auch erzeugt wird. Zusatz von Heteroauxin und Vitamin B_1 erhöht die Zahl noch über die bei einfachen Zuckerzusatz, besonders ist auch die Zahl der kleinen Stomata vermehrt. Vitamin C-Behandlung führt dagegen zu einer geringen Abnahme.

Daß die Spaltöffnungszahl durch Wirkstoffe erhöht werden kann, zeigte KROPFITSCH (1951) kürzlich an *Vicia Faba* für Äthylen. Wenn die Zahl der Stomata bei ultravioletter Bestrahlung abnahm, so erklärt sich dies vielleicht daraus, daß diese Strahlen nach DENFFER und SCHLITT (1951) die Wuchsstoffe zerstören. Nach BÜNNING und SAGROMSKY (1948) erfolgt die Verteilung der Spaltöffnungen in der Epidermis nicht planlos, vielmehr verbreitet jede Spaltöffnung um sich eine Hemmzone, in der keine weiteren Stomata entstehen können. Vielleicht wird diese Hemmung durch Wuchsstoffe überkompensiert.

Zur Klärung müßten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, vor allem solche, bei welchen die Wirkstoffe in Normalluft geboten werden.

Zusammenfassung und Besprechung der Hauptergebnisse.

Eine 1. Reihe von Versuchen galt der Entscheidung der Frage, ob die Entstehung pflanzlicher Wirkstoffe am Licht sich im Zusammenhang mit der Photosynthese der Kohlehydrate vollzieht oder von dieser unabhängig ist. Zu diesem Zwecke wurden Bohnenkeimpflanzen unter Verwendung verschiedener Substrate ohne CO_2 am Licht herangezogen. Als Kontrollen dienten in normaler Luft im Licht und im Dunkeln kultivierte Pflanzen. Die Versuche ergaben folgende Ergebnisse:

1. Keimpflanzen wurden mit Gartenerde als Substrat 6 Tage am Licht in Normalluft gezogen, dann 3 Tage lang verdunkelt. Das Aufhören der nyktinastischen Bewegung nach dieser Zeit bewies, daß die vorhandenen Wuchsstoffe (Auxin und β-Indolylessigsäure) erschöpft waren. Die Weiterkultur erfolgte ohne CO_2 am Licht; als Kohlenstoffquelle diente eine der Erde zugeführte 2%-Glukoselösung. Um störendes Längenwachstum zu verhindern und die Verzweigung zu fördern, wurden Versuchs- und Kontrollpflanzen dekapitiert. Beiderlei Serien begannen schon am 1. Tag wieder mit der Schlafbewegung, somit waren bereits Wuchsstoffe entstanden. Die Versuchspflanzen entwickelten sich überraschend gut, sie verzweigten sich reichlich und legten auch Blütenknospen an, die indessen vor dem Aufblühen abfielen. Ihre

Blätter waren bedeutend kleiner als die der Kontrollen, hell gelbgrün und chlorophyllarm. Sie enthielten nur Spuren von Stärke. Die Kontrollblätter hingegen hatten abends massenhaft Stärke gespeichert. Diese Differenz weist darauf hin, daß die Atmungskohlensäure, die nicht ausgeschaltet werden konnte, nicht zu einer nennenswerten Assimilation führte.

2. Der gleiche Versuch wurde mit Pflanzen durchgeführt, denen als Substrat ein Gemisch aus Ziegelbruchstücken und Sand geboten wurde, das erst mit einer Nährsalz-, später (bei der Belichtung ohne CO_2) mit einer Zuckerlösung versorgt war. Die Pflanzen entwickelten sich erst nicht anders als die in Erde; schließlich am Licht ohne CO_2 mit Zucker aber, stellten sie ihr Wachstum ein.

Die unter 1 und 2 angeführten Versuche lassen folgendes erkennen. Bei Zuckerzufuhr am Licht ohne CO_2 gezogene Pflanzen entwickeln sich nur in Erde, nicht aber in sterilem Substrat + Nährsalzen und Zucker. Somit muß entweder Zuckerzufuhr ohne Erde das Wachstum hemmen, oder es müssen im sterilen Substrat Wirkstoffe fehlen, die erst das Wachstum ermöglichen, und die in Erde vorhanden sind. Dabei wäre an Wuchsstoffe wie Heteroauxin oder auch an Humusderivate zu denken. Für die schädigende Wirkung spricht die Tatsache, daß auch mit CO_2 versorgte Kontrollpflanzen, wenn sie mit Zuckerlösung versorgt wurden, kümmern, kleinere Blätter entwickeln usw. Immerhin lassen die geschilderten Versuche auch die Deutung offen, daß ohne CO_2 am Licht keine für das Wachstum notwendigen Wirkstoffe gebildet werden können.

3. In allen folgenden Versuchen wurde als Substrat steriler Sand + Ziegelstückchen, versehen mit Nährsalz- und Glukoselösung, verwendet. Wurde diese Kombination geboten, so konnten sich keimende Bohnen, die jetzt sofort am Licht ohne CO_2 gezogen wurden, wieder nicht nennenswert entwickeln, sogar dann nicht, wenn die Kotyledonen erhalten blieben, noch weniger, wenn diese zu $^3/_4$ entfernt wurden. Dies führten wir in den meisten Versuchen durch, um die Reserven an Bau- und Wirkstoffen zu entfernen. Wieder scheint eine Schädigung durch Zucker vorzuliegen. Wir möchten diese damit erklären, daß der Zucker, infolge mangelnden Verbrauches durch Wachstum, sich, besonders in den Wurzeln, übermäßig anhäuft.

4. Während also alleinige Zuckerzufuhr nicht zur Entwicklung führt, was nach den vorhergehenden Versuchen auch zu erwarten war, erhielten wir gut entwickelte Pflanzen, wenn einer der Wirkstoffe: Heteroauxin 10^{-6}, Vitamin B_1 10^{-6}, Vitamin C 10^{-5} g/cm³, Hefeextrakt, Bohnenextrakt oder die Kombination Heteroauxin + Vitamin B_1 geboten wurde. Wurde indessen zu dieser Mischung noch Vitamin C gesetzt, so gediehen die Pflanzen nicht. Die übrigen Pflanzen ähnelten

denen, die in CO_2-freier Luft in Erde aufgewachsen waren, d. h. sie besaßen kleinere chlorophyllärmere Blätter als die Kontrollen (Licht + CO_2) und entwickelten schließlich abfallende Blütenknospen.

Diese Versuche lehren, daß die schädigende Wirkung des Zuckers erlischt, wenn Wirkstoffe zugesetzt werden. Besonders auffallend ist die Tatsache, daß jeweils einer der 3 Wirkstoffe genügt, um die Entwicklung anzuregen. Das läßt 2 Deutungen zu: Entweder kann ein Wirkstoff den anderen ersetzen oder die Zufuhr eines Stoffes führt zur Bildung eines oder mehrerer anderer. Zur Klärung dieser Frage wurde untersucht, welcher Gehalt an Auxin, Heteroauxin, Vitamin B_1 und Vitamin C in den Pflanzen der verschiedenen Versuchsserien vorhanden war. Zur Erfassung der Wuchsstoffe diente der *Avena*-Test; dabei wurden Auxin und Heteroauxin teils durch die Säure-Laugentrennungsmethode, teils durch Behandlung mit Erbsenenzym unterschieden. Zur Erfassung des Vitamin B_1-Gehaltes diente der *Phycomyces*-Test, Vitamin C wurde mit Dichlorphenolindophenol nachgewiesen.

5. Im Ätherextrakt der etiolierten und am Licht gezogenen Kontrollpflanzen, sowie der nur mit Zucker oder mit Vitamin B_1 versorgten Exemplare war von Wuchsstoffen nur Heteroauxin nachzuweisen; bei Vitamin C-Zusatz erschien neben wenig Heteroauxin reichlich Auxin (Säure-Laugenbehandlung). Bei Anwendung des Erbsenenzyms ergab sich das gleiche Resultat; nur die mit Vitamin C und Heteroauxin versorgten Pflanzen enthielten, und zwar reichlich, Auxin, die anderen Heteroauxin. Bohnenembryonen ohne Kotyledonen ($^3/_4$ davon entfernt) enthalten viel weniger Wuchsstoff als die Versuchspflanzen (vgl. Tabelle 3 und 4); deren Wuchsstoffe waren also neu gebildet worden. Im Alkoholextrakt fehlte Auxin den etiolierten und den nur mit Zucker und Vitamin B_1 versorgten Pflanzen, dagegen trat es wieder reichlich nach Heteroauxin- oder Vitamin C-Zusatz auf, jetzt aber auch in den Lichtkontrollpflanzen.

Im ganzen ergab sich also, daß Normalpflanzen beiderlei Wuchsstoffe besitzen, ohne CO_2 gezogene aber nur Heteroauxin, das auch bei CO_2-Zufuhr im Dunkeln entsteht, also bei *Phaseolus* in seiner Bildung nicht vom Licht und auch nicht von der Photosynthese abhängt. Auxin erscheint bei Zusatz von Vitamin C und Heteroauxin am Licht auch bei CO_2 Ausschluß. Seine Bildung ist also lichtabhängig, nicht aber durch die Photosynthese bewirkt. Es ist anzunehmen, daß das Auftreten von Auxin vom Redoxpotential der Gewebe abhängt. Auffällig ist, daß beim Auftreten des Auxins das Heteroauxin schwindet. Daß das Heteroauxin als Auxinaktivator dient, haben schon frühere Versuche unseres Institutes erwiesen, nunmehr kommt auch Vitamin C als aktivierende Substanz hinzu. Die Annahme, daß Darbietung eines Wirkstoffes die Entstehung eines anderen zur Folge hat, trifft also für diese beiden Substanzen zu. Wenn Vitamin B_1 in den Versuchen zu

guter Entwicklung führte, so geht dies nicht auf erhöhte Wuchsstoffbildung zurück. Somit muß Vitamin B_1 unter den gegebenen Umständen in der Lage sein, Auxin zu ersetzen.

6. Der Gehalt an Vitamin B_1 ist bei Kontrollpflanzen erheblich höher, als bei den etiolierten Exemplaren, seine Bildung wird also durch Licht gefördert. Am Licht ohne CO_2 gezogene Pflanzen zeigen bei bloßem Zuckerzusatz keine nennenswerte Zunahme; Heteroauxinzusatz hat keinen Effekt, Versorgung mit Vitamin C einen gegenüber bloßem Zucker sehr geringen, Zugabe von Vitamin B_1 selbst steigert den Gehalt über den der Kontrollen hinaus.

Die Menge des Vitamin B_1 kann also durch andere Wirkstoffe nicht nennenswert erhöht werden.

7. Der Gehalt an Vitamin C ist in den Lichtkontrollen am höchsten und sinkt in den etiolierten Pflanzen sehr stark ab. Schon alleiniger Zusatz von Zucker bewirkt am Licht ohne CO_2 einen beträchtlichen Anstieg, der bei Zugabe von Heteroauxin und Vitamin B_1 noch deutlich gefördert wird. Diese Wirkstoffe regen also die Bildung von Vitamin C an. Überraschenderweise kann Versorgung mit Vitamin C den Gehalt nicht auf die Höhe der Kontrollen bringen. Das führt zu dem Schluß, daß zwar Zuckerzusatz die Bildung der Ascorbinsäure fördert, die photosynthetische Zuckerbildung aber eine höhere Vitamin C-Produktion bewirkt.

8. Eine miskroskopische Untersuchung der Blätter ergab, daß der Blattbau durch CO_2-Entzug nicht besonders geändert wird. Doch tritt eine erhebliche Erhöhung der Spaltöffnungszahl ein, und vor allem erscheint ein besonderer Typus kleinerer Stomata, die an Normalpflanzen nur spärlich zu finden sind, jetzt sehr reichlich. Bei bloßem Zuckerzusatz ist die Anzahl der Spaltöffnungen schon mehr als verdoppelt, bei weiterem Zusatz von Heteroauxin oder Vitamin B_1 etwa verdreifacht. Vitamin C hat keinen Einfluß auf die Stomatazahl.

Im ganzen läßt sich also sagen: Bei Kultur in CO_2-freier Luft am Licht löst Zusatz von Heteroauxin oder Vitamin C die Bildung von Auxin (säure- und enzymfester Wuchsstoff) aus. Diese Auxinsynthese verläuft danach unabhängig von der Photosynthese, ist aber an Licht gebunden. Auch das Heteroauxin zeigt keine Beziehung zur Photosynthese, seine Bildung scheint sich sogar unabhängig vom Licht zu vollziehen.

Der Gehalt an Vitamin B_1 ist bei möglicher Photosynthese am höchsten. Bei Ausschluß von CO_2 am Licht können Zucker und Wirkstoffe den B_1-Gehalt nicht nennenswert erhöhen. Nur Vitamin C bewirkt eine schwache, Vitamin B_1 eine starke Steigerung. Danach wird die Bildung des Vitamin B_1 durch die Photosynthese gefördert.

Die Ascorbinsäurebildung zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom Zuckervorrat. Sie kann ohne Photosynthese vor sich gehen, wird durch diese aber wohl noch verstärkt.

Literatur.

Avery jr., G. S.: Bull. Torrey bot. Club **62**, 313 (1935). — Avery jr., G. S., J. Berger and R. O. White: Amer. J. Bot. **32** (1945). — Avery jr., G. S., P. R. Burkholder u. H. B. Creighton: Amer. J. Bot. **24** (1937). — Avery jr., G. S., H. B. Creighton and B. Shalucha: Amer. J. Bot. **27** (1940). — Bezler, W., u. E. Bünning: Naturwiss. **37** (1950). — Bonner, J., and J. Greene: Bot. Gaz. **100**, 226 (1938). — Bünning, E., u. H. Sagromsky: Z. Naturforsch. **3b**, 203 (1948). — Denffer, D. v., u. L. Schlitt: Naturwiss. **38**, 564 (1951). — Dettweiler, C.: Planta (Berl.) **33**, 258 (1943). — Erxleben, H.: Erg. Physiol. **37** (1935). — Dischendorfer, O.: Protoplasma (Berl.) **28**, 516 (1937). — Giroud, A., C. P. Leblond et R. Ratsimamanga: C. r. Soc. Biol. Paris **117**, 614 (1934a). — Giroud, A., R. Ratsimamanga et C. P. Leblond: C. r. Soc. Biol. Paris **117**, 612 (1934b). — Gustavson, F. G.: Amer. J. Bot. **26**, 189 (1939). — Guttenberg, H. v., u. I. Eifler: Noch nicht veröffentlicht. — Guttenberg, H. v., u. I. Feldmeier: Noch nicht veröffentlicht. — Guttenberg, H. v., u. L. Kröpelin: Planta (Berl.) **35**, 720 (1948). — Guttenberg, H. v., u. E. Lehle-Joergens: Planta (Berl.) **35**, 281 (1948). — Guttenberg, H. v., u. G. Nehring: Noch nicht veröffentlicht. — Guttenberg, H. v., u. I. Strutz: Arch. Mikrobiol. **17**, 189 (1952). — Hausen, S. v.: Ann. Acad. Sci. fenn., Ser. A **46**, 134 (1937). — Juhren, M., and F. W. Went: Amer. J. Bot. **36**, 552 (1949). — Kropfitsch, M.: Protoplasma (Berl.) **11**, 264 (1951). — Künning, H.: Planta (Berl.) **38**, 36 (1950). — Laibach, F.: Ber. dtsch. bot. Ges. **59** (1941). — Forschgn u. Fortschr. **18**, 156 (1942). — Laibach, F., u. F. I. Kribben: Z. Naturforsch. **4b** (1949). — Larsen, P.: Dansk bot. Ark. **11** (1944). — Mitchell, I., and M. R. Whitehead: Bot. Gaz. **102**, 393 (1940). Moewus, F.: Biol. Zbl. **68**, (1949). — Moldtmann, H. G.: Planta (Berl.) **30** (1939). — Molisch, H.: Ber. dtsch. bot. Ges. **39**, 136 (1921). — Navez, A. E.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **19**, 636 (1933). — Neubauer, M.: Protoplasma (Berl.) **33**, 346 (1939). — Ondratschek, K.: Arch. Mikrobiol. **11**, 89 (1940). — Overbeck, J. v.: Rec. Trav. bot. neerl. **30**, 538 (1933). — Bot. Gaz. **100**, 133 (1938). — Ray, S. N.: Biochemic. J. **28**, 996 (1934). — Reinert, J.: Z. Naturforsch. **5b**, 374 (1950). — Schopfer, W. H.: Bull. Soc. Chim. biol. Paris **17**, 1097 (1935). — Segelitz, G.: Planta (Berl.) **28** (1938). — Stewart, W. S.: Bot. Gaz. **101** (1940). — Tang, Y. K., and J. Bonner: Amer. J. Bot. **35**, 570 (1948). — Thimann, K. V., and F. Skoog: Proc. Roy. Soc. Lond. **114**, 317 (1934). — Tillmans: Z. Unters. d. Lebensm. **60**, 33 (1930). — Weber, F.: Protoplasma (Berl.) **29** (1938). — Weissenböck, K. u. M.: Protoplasma (Berl.) **34**, 585 (1940). — Went, F. W., and Carter: Amer. J. Bot. **35**, 95 (1948). — Wildman, S. G., and J. Bonner: Amer. J. Bot. **35**, 740 (1948). — Witsch, H. v.: Arch. Mikrobiol. **14**, 99 (1948). — Witsch, H. v., u. A. Flügel: Ber. dtsch. bot. Ges. **64** (1951). — Zhdanowa, L. P.: C. r. Acad. Sci. UdSSR. **24**, Nr 25 (1939).

Prof. H. v. Guttenberg, Rostock, Doberaner Str. **143**,
Botanisches Institut der Universität.

Planta, Bd. 41, S. 613—641 (1953).

Aus dem Botanischen Institut der Universität München.

ÜBER DEN EINFLUSS VON β-INDOLYLESSIGSÄURE AUF DEN STOFFWECHSEL IN VITRO KULTIVIERTER MAISWURZELN UND SPARGELSPROSSE.

Von

OTTO KANDLER und ANTONIE VIEREGG.

Mit 33 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. Dezember 1952.)

I. Einleitung.

SACHS (1882), der erstmals die Bedeutung stofflicher Faktoren für die Wachstums- und Differenzierungsvorgänge in der Pflanze erkannte, nahm an, daß diese von ihm als Bildungsstoffe bezeichneten Substanzen direkt in den Stoffwechsel eingreifen würden, indem sie mit den verschiedenen Bausteinen zusammen zu einer bestimmten Form erstarrten. Später, als die Wuchsstoff(WS)-Forschung immer größeren Umfang annahm, wurde nur mehr die Wirkung der Wuchsstoffe auf das Längenwachstum berücksichtigt und eine Beeinflussung des Stoffwechsels vielfach vollkommen abgelehnt. Die Zellstreckung sollte auf rein physikalische Weise, wie Membranumladungen, Erhöhung der Wasserpermeabilität und nachfolgende Steigerung des Turgors oder ähnliche Vorgänge zustande kommen. Dementsprechend zog man eine scharfe Grenze zwischen Streckungs- und Plasmawuchsstoffen (BOYSEN-JENSEN 1938).

In zahlreichen Arbeiten wurde der Einfluß der β-Indolylessigsäure (IES), die sich in den letzten Jahren endgültig als pflanzeneigener WS erwies (LANG 1949), auf das Längenwachstum geprüft. Für Wurzeln ergab sich dabei eine Optimumkurve, deren Maximum nach GEIGER-HUBER (1937) und FIEDLER (1936) zwischen 10^{-10} M und 10^{-12} M im Liter liegt. GAUTHERET (1942) gibt dagegen 10^{-10}—10^{-8} g IES/Liter als maximal fördernde Konzentration an. Für Sprosse ist die Kurve nach der Seite höherer Konzentration verschoben (vgl. BÜNNING 1948, SÖDING 1952).

Als erste wiesen BLANK u. FREY-WYSSLING (1941) darauf hin, daß bei der durch WS induzierten Streckung der Maiskoleoptile sich nicht nur die Membranen strecken, sondern auch die Zellzahl und die protoplasmatische Substanz vermehrt werden. Seit dieser Zeit konnte nun in einer Reihe von Arbeiten gezeigt werden, daß die WS-Wirkung von tiefgreifenden Stoffwechselveränderungen begleitet wird. Auf einen engeren Zusammenhang zwischen Atmung und Wachstum hatte BONNER

(1933) schon vor längerer Zeit hingewiesen und die Arbeiten von Commoner u. Thimann (1941), Thimann u. Bonner (1948, 1949) und Bonner u. Thimann (1950) ergaben, daß besonders der oxydative Abbau der C_4-Dicarbonsäuren eine wichtige Rolle beim Wachstumsprozeß spielt. IES vermag sowohl auf diese Vorgänge als auch auf einige andere Stoffwechselkomponenten zu wirken. So stellten Christiansen u. Thimann (1950a) fest, daß IES bei isolierten Erbsensprossen zu erhöhter Wasseraufnahme, gesteigertem Verbrauch an Zucker und vermehrter Synthese von Zellwandsubstanz führt. Auch der Fettverbrauch erwies sich unter IES-Einwirkung erhöht (Christiansen u. Thimann 1950b). Abnahme des Aminosäuregehaltes, gesteigerte Proteinsynthese und vermehrter Asparagingehalt werden von Christiansen u. Thimann (1950c) geradezu als Kriterien der IES-Wirkung bezeichnet. Daß es sich dabei nicht um eine unspezifische Folgeerscheinung der Wachstumshemmung, wie sie bei den verwendeten hohen IES-Konzentrationen auftrat, handeln konnte, ergab sich bei Versuchen von Thimann u. Mitarb. (1950), die am gleichen Objekt auf osmotischem Wege eine Wachstumshemmung herbeiführten und durchaus andere Stoffwechselveränderungen fanden.

Bonner und Wildman (1947) gelang die Isolierung einer Phosphatase, deren Co-Ferment IES sein soll. Daran knüpft sich die Vorstellung, daß die IES in den Phosphathaushalt, der im Energiehaushalt der Zelle bekanntlich eine zentrale Stellung einnimmt, eingreift. Tatsächlich konnte Bonner auch eine Erhöhung des anorganischen Phosphatspiegels bei *Avena*-Koleoptilen nach IES-Einwirkung finden (vgl. Guttenberg 1950). Weitere experimentelle Befunde in dieser Richtung wären aber dringend erwünscht, bevor diese Vorstellungen weiter ausgebaut werden können.

Die morphologische Wirkung des Lichtes auf die Pflanzen wird vielfach durch eine Beeinflussung des WS-Spiegels durch die Belichtung erklärt. Während Oppenorth (1941) gesteigerte Auxinbildung im Licht annimmt, Gustafson (1946) eine Photoinaktivierung des IES beschreibt, Tang u. Bonner (1947) eine im Licht herabgesetzte Bildung eines IES-inaktivierenden Enzymes vermuten, fanden Galston u. Mitarb. (1949a, 1949b, 1951), daß die Lichtwachstumshemmung durch Oxydation der IES zustande kommt. Dabei soll die Oxydation durch das Zusammenwirken von Riboflavin, dem Lichtperzeptor, und einer Peroxydase erfolgen.

Trotz dieser vielfachen Hinweise auf eine Beeinflussung des Stoffwechsels durch IES ist es heute noch unmöglich, ein geschlossenes Bild dieser Wirkungen zu entwerfen, da alle diese Versuche an sehr verschiedenen Objekten und mit nicht vergleichbarer Methodik ausgeführt wurden. Außerdem handelt es sich meist nur um Kurzversuche und

nicht um Beobachtungen während längerer Kultur der mit IES behandelten Pflanzen. Die Kultur pflanzlicher Organe in vitro, wie sie von KOTTE (1922), ROBBINS (1922), LOO (1945) begründet wurde, schien geeignet, mehrere Stoffwechselvorgänge gleichzeitig und am gleichen Material während des Wachstums und in Abhängigkeit von der IES-Zufuhr zu untersuchen. In vorliegender Arbeit wurden dazu einerseits Maiswurzeln, andererseits Spargelsprosse verwendet, um sowohl die unterschiedliche Reaktivität der beiden Organe auf WS als auch das Zusammenwirken von Belichtung und WS bei den ergrünenden Sprossen erfassen zu können. Die Verwendung isolierter Organe an Stelle ganzer Ptlanzen, die sich in vitro ebensogut kultivieren lassen, hat den Vorteil, daß korrelative Wirkungen der Organe aufeinander ausgeschlossen sind.

II. Material und Methodik.

Um sterile Wurzel- bzw. Sproßspitzen zu erhalten, wurden die Maiskörner (Sorte Badischer Landmais) und Spargelsamen je nach dem Alter derselben 20—45 min in konzentriertes Bromwasser gelegt, mit sterilem Wasser bromfrei gewaschen und auf 5 mm dicken Agarplatten zum Auskeimen ausgelegt. Bei 27° C bildeten die Maiskörner nach 3—4 Tagen etwa 20 mm lange Wurzeln aus, von denen Spitzen mit je 8 mm Länge abgeschnitten und je 4 in die mit 10 cm^3 Nährlösung beschickten Kulturgefäße (Erlenmeyerkölbchen mit 50 cm^3 Fassungsvermögen) übertragen wurden. Die Spargelsamen bildeten erst nach 14 Tagen genügend lange Sprosse, die dann auf 10 mm Länge abgeschnitten und zu je 5 in einem Gefäß kultiviert wurden. Die Kultur erfolgte bei 27° C in der Klimakammer. Dabei standen die Kölbchen auf einer Schüttelmaschine (50 Schwingungen je Minute), um eine bessere O_2-Versorgung zu gewährleisten.

Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung (modifiziert nach WHITE, 1943): 1000 cm^3 Aqua dest., 360 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 200 mg $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 580 mg KNO_3, 65 mg KCl, 16 mg KH_2PO_4, Spur $FeSO_4$, 1 cm^3 HOAGLANDsche A-Z-Lösung, 10 g Glucose. Die Sterilisation der Nährlösung erfolgte durch dreimaliges Erhitzen im Dampftopf. Als Verschluß der Kulturgefäße dienten wie üblich Wattestopfen. Alle Glaswaren wurden mit Bichromat-Schwefelsäure gereinigt und auf gründliches Nachwaschen zur Entfernung der Chrom-II-Ionen wurde geachtet.

Die IES-Lösungen wurden aus einem MERCKschen Präparat für jede Versuchsserie frisch bereitet, die entsprechend konzentrierten Stammlösungen mit Hilfe eines Membranfilters entkeimt und den sterilisierten Nährlösungen zupipettiert. Jede Versuchsserie umfaßte gewöhnlich 40 einzelne Kulturen. Bei den Wurzelkulturen enthielten je 8 Kölbchen 10^{-5}, 10^{-7}, 10^{-9} bzw. 10^{-11} M IES. Acht Gefäße blieben ohne Zusatz. Von

den Sproßkulturen enthielt die Hälfte der Kulturgefäße 10^{-5} M IES, die andere Hälfte keine IES. Während der Kultur blieb von jedem Ansatz die Hälfte der Kölbchen verdunkelt, die andere wurde mittels einer 100 Watt-Lampe von oben belichtet. Die Beleuchtungsstärke betrug etwa 1000 Lux.

Bei einer Anzahl von Versuchsreihen erfolgte die Kultur direkt in den Atmungströgen der Warburg-Apparatur, die in diesen Fällen mit je 5 cm³ Nährlösung und entsprechenden IES-Zusätzen versehen waren und wie die anderen Kulturgefäße sterilisiert wurden. Unterhalb des Schliffes zum Ansetzen der Manometer besaßen die Atmungströge eine kropfartige Erweiterung, in der auch während der Messung ein Wattebausch verblieb, um Infektionen zu vermeiden. Auf diese Art konnte der Sauerstoffverbrauch auch während der Kultur kontinuierlich gemessen werden. Der O_2-Vorrat in den Atmungströgen reichte nicht für die gesamte Kulturzeit aus, weshalb in Abständen von 48 Std frische Luft durchgeblasen wurde.

Zur kurzfristigen Atmungsmessung dienten kleinere Atmungströge ohne kropfartige Erweiterung mit einem Volumen von rund 15 cm³. Die Messungen wurden nach den Angaben von Dickens (1941) ausgeführt. Zur Bestimmung des Respiratorischen Quotienten (RQ) kamen die Gefäße nach Dixon zur Verwendung. Während der Atmungsmessung befanden sich die Wurzeln nicht in Nährlösung, sondern in m/45 Phosphatpuffer mit $p_H = 5{,}2$. Als Maß der Atmungsintensität wird in dieser Arbeit stets der O_2-Verbrauch benützt, der jeweils je Stunde und Milligramm Trockengewicht bzw. Stickstoff berechnet ist. Der dafür eingeführte Ausdruck Qo_2 wird dementsprechend durch einen weiteren Index, der angibt, ob sich die Berechnung auf Trockengewicht oder Stickstoff bezieht, ergänzt. Dieses Vorgehen erweist sich bei pflanzlichem Gewebe als nötig, weil das Verhältnis von Trockengewicht zu Eiweiß außerordentlich verschieden sein kann. Für die Atmungsgröße kann aber nur der Eiweißgehalt eine befriedigende Bezugsgröße darstellen (vgl. Kandler 1950).

Zur Ermittlung der Assimilationsleistung der Spargelsprosse wurden die Atmungströge mit Hilfe einer 200 Watt-Lampe gleichmäßig belichtet, so daß wie bei den Kulturen in Erlenmeyerkölbchen eine Beleuchtungsstärke von 1000 Lux erreicht wurde. Die Assimilation überschritt bei dieser Beleuchtung den Kompensationspunkt nicht, sondern näherte sich diesem mit zunehmendem Ergrünen im Laufe der Kultur an. Es brauchte daher auch keine Vorkehrung für zusätzliche CO_2-Versorgung getroffen zu werden. Alle 24 Std wurde die Belichtung für einige Stunden unterbrochen und die Atmung bestimmt. Die Differenz zwischen dem O_2-Verbrauch im Licht und in Dunkelheit gibt die Assimilationsleistung an.

Von den in Erlenmeyerkölbchen ausgeführten Versuchen wurden nach jeweils 2, 4 und 7 Tagen bei den Wurzeln, bzw. 3, 6 und 10 Tagen bei den Sprossen je 2 der Parallelproben entnommen und wie folgt verarbeitet: Nach Entnahme der Wurzeln oder Sprosse aus den Kulturgefäßen wurden sie gründlich abgewaschen und nach der Längenmessung zur Bestimmung der Atmungsintensität in die Atmungströge der Warburg-Apparatur gegeben. In der restlichen Nährlösung und den Waschwässern wurde die Restglucose nach BERTRAND (vgl. BERTHO-GRASSMANN 1936) bestimmt. Nach der Atmungsmessung kamen die Wurzeln in Wägegläschen und wurden nach der Trockengewichtsbestimmung (getrocknet bei 105° C) noch einer Stickstoffanalyse nach KJELDAHL (vgl. KLEIN 1931) unterworfen. Bei einem Stickstoffgehalt von 0,3 bis 1,0 mg wurde bei der Destillation n/50 HCl vorgelegt und azidimetrisch mit n/50 NaOH titriert. 1,0 cm^3 Säureverbrauch entsprachen dabei 0,28 mg Stickstoff. Kontrollanalysen mit eingewogenem Harnstoff ergaben eine Fehlergrenze von $\pm 5\%$.

Bei geringeren Stickstoffmengen wurde als Vorlage n/200 H_2SO_4 verwendet und die Restsäure jodometrisch bestimmt (KLINGMÜLLER 1950). 1 cm^3 verbrauchten $Na_2S_2O_3$ entspricht in diesem Falle 0,07 mg Stickstoff.

Bei einigen Versuchsreihen wurde der Stickstoffgehalt noch in den trichloressigsäure(TES)-löslichen und -unlöslichen Anteil aufgegliedert, wobei der lösliche den Nitrat-, Ammoniak-, Aminosäuren- und Amidstickstoff, der unlösliche den Eiweißstickstoff enthält. Dazu wurden die Wurzeln nicht getrocknet, sondern nach Bestimmung des Frischgewichtes mit einigen Tropfen 6% TES in einem Mörser zu einem Brei verrieben, mit 6% TES auf 6 cm^3 aufgefüllt und $^3/_4$ Std stehengelassen. Nach Zentrifugieren und Nachwaschen mit 6% TES wurde auf 10 cm^3 aufgefüllt, 0,4 cm^3 kamen zur papierchromatographischen Untersuchung der Aminosäuren zur Verwendung und der Rest wurde ebenso wie der Niederschlag mit H_2SO_4 verascht und einer Stickstoffanalyse unterworfen.

Die Analyse der Aminosäuren der Gewebeextrakte sowohl als auch der Nährlösung erfolgte nach den üblichen Methoden (vgl. CRAMER 1951). Als Lösungsmittel dienten die 3 folgenden Gemische:

1. wassergesättigtes Phenol mit HCN in der Gasphase;

2. 70% Picolin, 28% Wasser, 2% konzentriertes Ammoniak; mit NH_3 in der Gasphase.

3. 70% Isopropylalkohol, 20% Eisessig, 10% Wasser.

Bei geringer Aminosäurekonzentration wurden jeweils viele Tropfen der Lösung aufeinandergesetzt, nachdem das Eintrocknen mit Hilfe eines Föhns beschleunigt worden war. Eine grobe quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte nach dem von POLSEN u. Mitarb. (1947)

vorgeschlagenem Fleckenverdünnungsverfahren, das bereits kürzlich (Kandler 1951) ebenfalls angewendet worden war.

Einige weitere Versuchsreihen dienten zur Untersuchung des anorganischen Phosphatspiegels in der Wurzel. Dazu wurden die Wurzeln wiederum in 6% TES zerrieben und nach $^3/_4$ Std Extraktion die Suspension abzentrifugiert und in der völlig klaren überstehenden Lösung nach Martland u. Robison (1926) das anorganische Phosphat bestimmt. Die Blaufärbung wurde nach 30 min mit Hilfe eines Pulfrich-Photometers ausgemessen und auf Grund einer empirischen Eichkurve der absolute Phosphatgehalt errechnet.

Die IES-Bestimmungen in der Nährlösung (Modellversuche) wurden nach der Methode von Tang u. Bonner (1947) durchgeführt. Der Chlorophyllgehalt von Sprossen konnte nach Extraktion mit Methanol ebenfalls mit dem Pulfrich-Photometer ausgemessen werden. Dabei wurden keine Absolut-, sondern nur Relativwerte ermittelt.

Während die Länge an einzelnen Wurzeln und Sprossen gemessen wurde, mußte zu den übrigen Bestimmungen das ganze aus 4 Wurzeln bzw. Sprossen bestehende Material eines Kulturgefäßes gemeinsam analysiert werden, um genau genug meßbare Mengen zu erhalten. Die einzelnen Versuchsreihen wurden mehrmals wiederholt und aus den entsprechenden Parallelproben der gleichen Versuchsanstellung die Mittelwerte errechnet, die als Grundlage für die im folgenden vorgelegten Kurvenbilder dienten.

Bei physiologischen Versuchen kommt es häufig vor, daß einzelne Werte einer Reihe von Parallelproben besonders weit von den übrigen abweichen, weil bei den Analysen irgendwelche einmaligen Fehler auftraten. Diese sog. „Ausreißer" mit in den Mittelwert einzubeziehen wäre fehlerhaft, da ihre Abweichung nicht auf der für die anderen Werte gültigen Streuung des Materials bzw. normalen Fehlerquellen der Analysen beruhen und diese Werte demnach nicht zur gleichen statistischen Masse gehören. Es erscheint daher wünschenswert, vor der Bildung des Mittelwertes eine Homogenitätsprüfung durchzuführen, die eine Ausscheidung derartiger Werte ermöglicht. Lode (1948) hat ein graphisches Verfahren ausgearbeitet, das es ermöglicht, gleichzeitig mit einer Überprüfung der Homogenität den Mittelwert und die Streuung der Einzelmessung zu berechnen.

Dem Verfahren liegt wie allen üblichen Fehlerrechnungen die Gausssche Methode der kleinsten Quadrate zugrunde, und es beruht auf der von Hazen entdeckten Darstellung Gaussscher Verteilungen durch Geraden. Trägt man in einem Ordinatensystem auf der Ordinate die zu untersuchenden Meßwerte in aufsteigender Reihenfolge an, auf der Abszisse das Summenhäufigkeitsprozent (Wahrscheinlichkeitspapier, Schleicher & Schüll, Nr. 298$^1/_2$), so ergeben die Schnittpunkte der Ge-

raden über den Meßwerten und den zugehörigen Summenhäufigkeitsprozenten die sog. HAZENsche Gerade. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Ordinatenlinie 50% ergibt den Mittelwert, jene mit den Ordinatenlinien 15,9% und 84,1% ergeben die Streuung. Zur Vereinfachung des Verfahrens wurden, wie von LODE (1948) vorgeschlagen, die den verschiedenen Anzahlen von Meßwerten entsprechenden Abszisseneinteilungen an den Katheten rechtwinkeliger Dreiecke angezeichnet, so daß der jeweilig zutreffende Dreiecksschenkel nur an der die Meßwerte enthaltenden Ordinate entlanggeführt werden mußte, um die Punkte für die HAZENsche Gerade zu erhalten. Die Berechnung der Summenhäufigkeitsprozente für jeden einzelnen Wert erübrigte sich damit. Liegt die auf diese Weise erhaltene Punktschar wirklich auf einer Geraden, bzw. läßt sich durch sie eine Gerade legen, von der die Punkte nach links und rechts annähernd gleich stark abweichen, so darf man die Fehlerverteilung als der GAUSSschen Glockenkurve entsprechend ansehen und die Werte zu einem Mittelwert vereinigen. Liegen aber einige Punkte deutlich außerhalb dieser Geraden, so zeigen sie damit an, daß sie nicht zur selben statistischen Masse gehören wie die übrigen und eliminiert werden müssen. Mit dem Rest der Werte wird dann erneut die gleiche Prüfung vorgenommen.

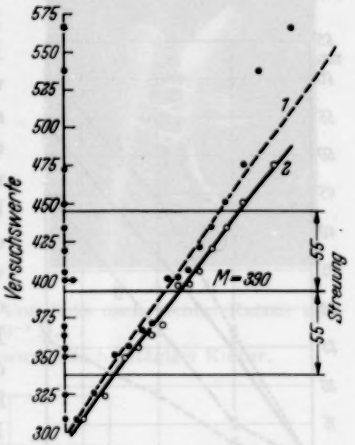


Abb. 1. Beispiel für das graphische Verfahren zur Homogenitätsprüfung und Mittelwertsbestimmung nach LODE. Punkte: Vorhandene Versuchsdaten aus 15 Stickstoffanalysen 4 Tage alter Maiswurzeln. Kreise: Versuchswerte, die der Wahrscheinlichkeitsverteilung entsprechen.

Dieses graphische Verfahren bietet bei größeren Reihenuntersuchungen große Arbeitserleichterung und wurde zur statistischen Auswertung aller in dieser Arbeit vorgelegten Daten verwendet. In Abb. 1 ist ein Beispiel des Verfahrens dargestellt. Von den 15 Werten für den Stickstoffgehalt 4 Tage kultivierter Maiswurzeln liegen 13 annähernd auf einer Geraden, während 2 extrem hoch sind und nicht als zur Geraden gehörig gerechnet werden können. Sie wurden daher verworfen, die restlichen 12 Werte erneut nach der Summenhäufigkeitsprozentskala für eine Zwölferteilung angetragen und der nunmehr ermittelte Mittelwert und die zugehörige Streuung für die Kurvendarstellung (Abb. 8) benützt. In den Kurven der folgenden Abbildung ist die Streuung des Mittelwertes ($m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$) als Abszissenabschnitt nach beiden

Seiten der jeweiligen Mittelwerte angetragen. In der Unterschrift findet sich die Angabe der zur Berechnung herangezogenen Anzahl von Messungen.

III. Versuchsergebnisse.

1. Untersuchungen an Maiswurzeln.

a) Das Längenwachstum in Abhängigkeit von Wuchsstoffkonzentration und Kulturdauer. Zunächst wurde ein Konzentrationsbereich von 10^{-5} M bis 10^{-12} M IES in bezug auf die Beeinflussung des Längenwachstums hin untersucht. Dabei zeigte 10^{-5} M eine sehr starke Hemmung des Längenwachstums, die bei stärkerer Verdünnung abklang und bei 10^{-8} M völlig verschwand. 10^{-9} M bewirkte eine leichte Förderung, schwächere Konzentrationen erwiesen sich als wirkungslos. Alle weiteren Versuche wurden dann nur noch mit 3 verschiedenen Konzentrationen ausgeführt, nämlich mit der stark hemmenden 10^{-5} M, der schwach hemmenden 10^{-7} M und der fördernden 10^{-9} M. Abb. 2 zeigt die Gesamtlänge der Wurzeln entsprechender Ansätze nach 2, 4 und 7 Tagen. Während die Hemmung durch 10^{-5} M und 10^{-7} M statistisch gut gesichert ist, ist die 10—15%ige Förderung durch 10^{-9} M statistisch kaum zu sichern. Daß frühere Autoren, wie eingangs erwähnt, erst bei 10^{-11} M eine Förderung erzielten, läßt sich aus der unterschiedlichen Kulturmethode erklären. Damals wurden Agarnährböden, bei den hier berichteten Versuchen nur flüssige Nährböden verwendet. Wie bereits kürzlich (Kandler 1953) berichtet, ergeben sich dabei starke quantitative Unterschiede im Wachstum.

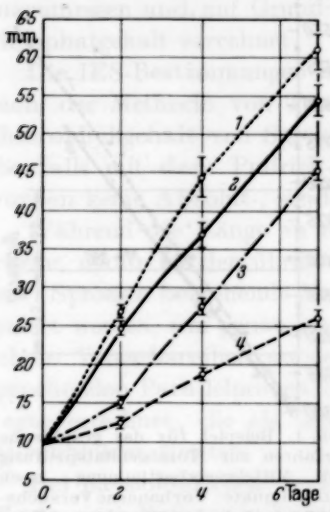


Abb. 2. Gesamtlänge bei 10^{-5} M (*4*), 10^{-7} M (*3*), 10^{-9} M (*1*) und ohne IES (*2*). *n* nach 2 Tagen: 1 = 34, 2 = 49, 3 = 25, 4 = 55; nach 4 Tagen: 1 = 26, 2 = 47, 3 = 21, 4 = 45; nach 7 Tagen: 1 = 24, 2 = 34, 3 = 20, 4 = 40.

Die im Längenwachstum gehemmten Wurzeln waren gleichzeitig sehr stark verdickt und zeigten eine starke Wucherung des Rindenparenchyms, wie bereits früher berichtet (Kandler 1950). Die geförderten Wurzeln hatten gleiches Aussehen wie die normalen (Abb. 3). Nebenwurzeln traten bei den Kontrollen bereits nach 3 Tagen auf; bei den gehemmten dagegen erst nach 8—10 Tagen. Jedenfalls traten sie erst zu diesem Zeitpunkt äußerlich in Erscheinung, nachdem sie vorher bereits angelegt, aber so stark gehemmt waren, daß sie die Rinde nicht durchstoßen konnten. Ganz allgemein war bei längerer Kulturdauer eine Enthem-

mung des Längenwachstums zu beobachten. Die Hauptwurzel nahm etwa vom 10. Kulturtage ab das normale Längenwachstum wieder auf und die Nebenwurzeln entwickelten sich normal (Abb. 4). Es lag der Gedanke nahe, daß die IES in diesem Zeitraum zerstört worden war, da sie in wäßriger Lösung bei niederem p_H bekanntlich nicht sehr beständig ist.

In einem Modellversuch wurde mit Hilfe des Reagens nach TANG und

Abb. 3.

Abb. 4.

Abb. 3. Maiswurzeln nach 6tägiger Kulturdauer. Von links nach rechts: Kultur mit 10^{-5} M, ohne IES, mit 10^{-3} M.

Abb. 4. Eine mit 10^{-5} M kultivierte Maiswurzel nach 10tägiger Kultur.

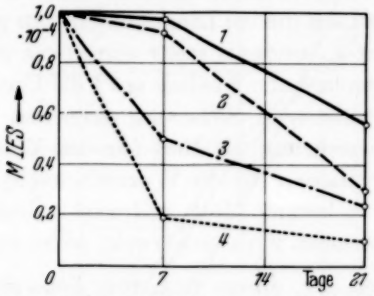


Abb. 5. Abnahme der IES-Konzentration bei pH 5,5 im Dunkeln (*1*) und im Licht (*3*), sowie bei pH 4,6 im Dunkeln (*2*) und im Licht (*4*).

BONNER (1947) die IES-Abnahme im Laufe von 3 Wochen untersucht. Die 10^{-4} M IES enthaltenden Erlenmeyerkölbchen wurden in der Zwischenzeit wie die Wurzelkulturen auf der gleichen Schüttelmaschine geschüttelt, wobei ein Teil der Proben, den später zu beschreibenden Sproßkulturen entsprechend, belichtet waren. Abb. 5 zeigt das Ergebnis. Bei $p_H = 5{,}5$, dem üblichen p_H-Bereich der Wurzelkulturen, nimmt die IES-Konzentration im Dunkeln innerhalb der ersten 8 Tage nur sehr wenig ab. Erst nach 3 Wochen ist sie auf die Hälfte abgesunken. Stärker ist die Abnahme bei $p_H = 4{,}6$. Bei Belichtung fällt die Konzentration bereits in den ersten Tagen sehr stark ab. Daraus ergibt sich, daß das normale Weiterwachsen der ursprünglich gehemmten

Wurzeln nicht durch eine Abnahme der IES-Konzentration in der Nährlösung erklärt werden kann. Es muß sich dabei um eine allmählich vollzogene Umstimmung in der Reaktionsbereitschaft der Wurzel auf IES handeln, wie sie auch bei anderen Gewebekulturen von Gautheret (1942, 1948), Morel (1947) und Kandler (1952) beobachtet wurde. Freilich besteht zwischen beiden Beobachtungen ein wesentlicher Unterschied darin, daß im Falle der Gewebekulturen das veränderte Gewebe auch äußerlich anders gestaltet war als früher, bei den Wurzelkulturen jedoch die normale Wachstumsweise wieder hergestellt wurde. Eine genauere Untersuchung dieser „Umstimmungen" könnte für das Verständnis der WS-Forschung wertvolle Beiträge liefern.

b) Die Trockengewichtszunahme in Abhängigkeit von der IES-Konzentration. Vielfach wird das Längenwachstum als Maß für das Wachstum schlechthin angesehen. Aus Abb. 6, die die Trockengewichtszunahme der gleichen Wurzeln, von denen Abb. 2 die Längenzunahme enthält, darstellt, geht jedoch überzeugend hervor, daß der Hemmung des Längenwachstums durchaus keine entsprechende Hemmung der Substanzvermehrung gegenübersteht. Nur in den ersten Tagen ist diese bei den starken Konzentrationen leicht gehemmt, später aber sind die bei 10^{-5} M IES kultivierten Wurzeln um 30% schwerer als die Kontrolle. Im Gegensatz dazu weisen die im Längenwachstum geförderten Wurzeln durchaus kein erhöhtes, sondern sogar ein etwas niedrigeres Trockengewicht als die Kontrolle auf. Freilich sind die Unterschiede so gering, daß sich keinerlei statistische Sicherung erreichen läßt. Benützt man also die Substanzvermehrung als Maß für das Wachstum, so sind die hohen IES-Konzentrationen für die Wurzeln wachstumsfördernd.

Besonders deutlich kommt diese unterschiedliche Wirkung auf die beiden Wachstumsprozesse zum Ausdruck, wenn man den Quotienten $\frac{\text{Länge}}{\text{Trockengewicht}}$ bildet, der, einem früheren Vorschlag (Kandler 1953) entsprechend, als spezifische Länge bezeichnet wird. Abb. 7 zeigt die kurvenmäßige Darstellung der Abhängigkeit der spezifischen Länge von der IES-Konzentration zu den verschiedenen Kulturzeiten. Würde die IES alle Wachstumsprozesse gleichmäßig beeinflussen, so ergäbe sich eine Parallele zur Abszisse. Der steile Abfall der Kurven bei den hohen Konzentrationen zeigt jedoch an, daß besonders die Differenzierungsprozesse betroffen werden.

c) Der Stickstoffhaushalt der isolierten Wurzeln in Abhängigkeit von der IES-Konzentration. Ob die Vermehrung des Trockengewichtes durch hohe IES-Konzentrationen nur auf der vermehrten Bildung von Wandsubstanz oder auch auf Verbesserung der Eiweißsynthese beruht, konnte durch die Bestimmung des organisch gebundenen Stickstoffes entschieden werden. Abb. 8 zeigt die Kurven für den Stickstoffgehalt. Die

hohen Konzentrationen bewirken zunächst eine geringe Hemmung des Stickstoffeinbaues gegenüber der Kontrolle, nach 7 Tagen weisen aber

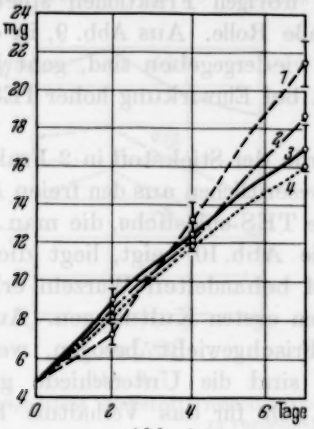


Abb. 6.

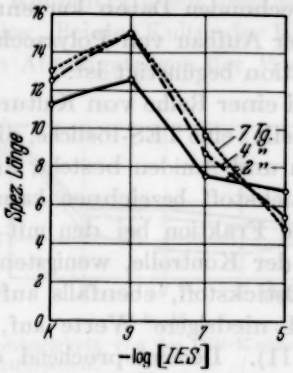


Abb. 7.

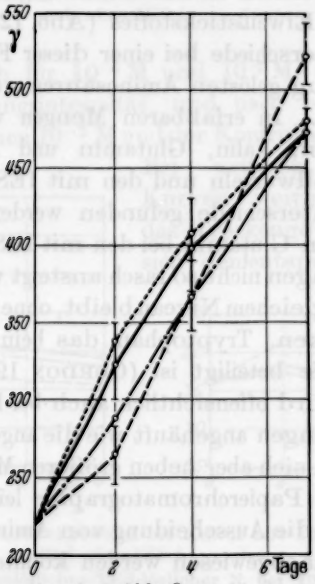


Abb. 8.

Abb. 6. Trockengewicht bei Kultur mit 10^{-5} M (*1*), 10^{-7} M (*2*), 10^{-9} M (*4*) und ohne IES (*3*). *n* nach 2 Tagen: 1 = 10, 3 = 10; nach 4 Tagen: 1 = 11, 3 = 12; nach 7 Tagen: 1 = 8, 2 = 10.

Abb. 7. Spezifische Länge in Abhängigkeit von der IES-Konzentration zu verschiedenen Kulturzeiten.

Abb. 8. Gesamtstickstoffgehalt bei 10^{-5} M (— — —), 10^{-7} M — · — ·), 10^{-9} M (---) und ohne IES (—). *n* nach 2 Tagen: 10^{-5} = 12, Kontrolle = 12; nach 4 Tagen: 10^{-5} = 13, Kontrolle = 11; nach 7 Tagen: 10^{-5} = 6, Kontrolle = 10.

die Proben mit 10^{-5} M doch eine deutliche Erhöhung auf. Auch hier besteht also keine Parallelität zum Längenwachstum, sondern mehr zum

Verhalten des Trockengewichtes. Bildet man das Verhältnis Stickstoff/Trockengewicht, so ergibt sich, ob die Eiweiß- oder die Polysaccharidsynthese bevorzugt wird, denn die übrigen Fraktionen spielen bei den Wurzeln mengenmäßig keine große Rolle. Aus Abb. 9, in der die entsprechenden Daten kurvenmäßig wiedergegeben sind, geht hervor, daß der Aufbau von Polysacchariden bei Einwirkung hoher IES-Konzentration begünstigt ist.

Bei einer Reihe von Kulturen wurde der Stickstoff in 2 Fraktionen aufgeteilt: eine TES-lösliche, die im wesentlichen aus den freien Aminosäuren und Amiden besteht, und eine TES-unlösliche, die man als Eiweißstickstoff bezeichnen kann. Wie Abb. 10 zeigt, liegt die TES-lösliche Fraktion bei den mit 10^{-5} M behandelten Wurzeln erheblich unter der Kontrolle, wenigstens in den ersten Kulturtagen. Auch der Eiweißstickstoff, ebenfalls auf das Frischgewicht bezogen, weist bei 10^{-5} M niedrigere Werte auf, doch sind die Unterschiede geringer (Abb. 11). Dementsprechend ergibt sich für das Verhältnis Eiweißstickstoff/löslicher Stickstoff in den ersten Tagen eine starke Verschiebung zugunsten des Eiweißstickstoffes (Abb. 12). 10^{-9} M verursachte keine erfaßbaren Unterschiede bei einer dieser Fraktionen.

Die im TES-Auszug gelösten Aminosäuren wurden papierchromatographisch untersucht. In erfaßbaren Mengen waren Asparaginsäure, Serin, Alanin, Leucin, Valin, Glutamin und Asparagin vorhanden. Zwischen den Kontrollwurzeln und den mit IES behandelten konnten keine erheblichen Unterschiede gefunden werden. Bemerkenswert ist nur, daß der Gehalt an Glutamin bei den mit IES behandelten Wurzeln in den ersten Kulturtagen nicht so rasch ansteigt wie bei den Kontrollen, aber längere Zeit auf gleichem Niveau bleibt, ohne wie bei den Kontrollen wieder rasch abzusinken. Tryptophan, das beim Auf- und Abbau der IES als Zwischenstufe beteiligt ist (Gordon 1949), konnte nicht gefunden werden. Es wird offensichtlich auch bei hohen IES-Konzentrationen nicht in den Mengen angehäuft wie die angeführten Aminosäuren. Geringe Spuren lassen sich aber neben größeren Mengen anderer Aminosäuren mit Hilfe der Papierchromatographie leider nicht nachweisen.

Nachdem kürzlich die Ausscheidung von Aminosäuren durch in vitro kultivierte Wurzeln nachgewiesen werden konnte (Kandler 1951), lag es nahe, die Wurzelausscheidungen auch in diesen Versuchen zu untersuchen. Aus der Tabelle 1 geht hervor, daß 10^{-5} M IES die Ausscheidung von Aminosäuren vollständig hemmt. Zum Teil mag daran die Verschiebung des Verhältnisses löslicher/unlöslicher Stickstoff beteiligt sein, wahrscheinlich liegen aber auch bei den behandelten Wurzeln andere Permeabilitätsverhältnisse vor. Permeabilitätsänderung als Folge von IES-Einwirkung wird ja vielfach geradezu als Primärwirkung angesprochen.

d) Die Atmung isolierter Maiswurzeln in Abhängigkeit von der IES-Konzentration. In Kurzversuchen konnte nur bei Verwendung sehr hoher Konzentrationen wie 10^{-4} M und 10^{-5} M eine Verminderung des O_2-Verbrauches beobachtet werden. Schwächere Konzentrationen blieben wirkungslos. Bei der Kultur der Wurzeln in den Atmungströgen der Warburg-

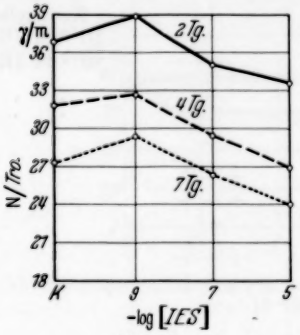


Abb. 9.

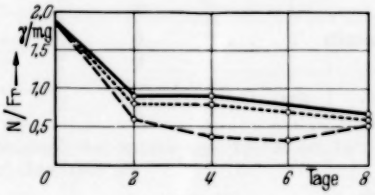


Abb. 10.

Abb. 9. Quotient Stickstoff/Trockengewicht in Abhängigkeit von der IES-Konzentration zu verschiedenen Kulturzeiten.

Abb. 10. TES-löslicher N/Frischgewicht bei Kultur mit 10^{-5} M (— — —) 10^{-9} M (····), und ohne IES (———).

Apparatur ergibt sich für 10^{-5} M und 10^{-7} M in den ersten 12 Std ein Abfall der Atmungsintensität, und nach etwa 2 Tagen beträgt der Unterschied zwischen 10^{-5} M und der Kontrolle bereits 40% (Abb. 13). Bei weiterer Kultur laufen die Kurven weitgehend parallel. Auf das Trockengewicht bezogen, ergibt sich dementsprechend ebenfalls eine

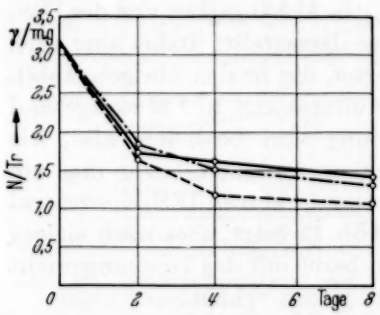


Abb. 11.

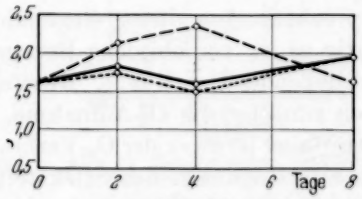


Abb. 12.

Abb. 11. TES-unlöslicher N/Frischgewicht bei Kultur mit 10^{-5} (— — —), 10^{-9} M (— · — und ohne IES (———).

Abb. 12. Verhältnis TES-unlöslicher/TES-löslicher N bei 10^{-5} M (— — —), 10^{-9} M (····) und ohne IES (———).

geringere Sauerstoffaufnahme. Benützt man jedoch den Stickstoff als Bezugsgröße, so verschwindet die Atmungshemmung und es errechnet sich sogar eine Förderung. Besonders deutlich ist dies bei den in Erlenmeyerkölbchen ausgeführten Versuchen der Fall, wo die Werte für den O_2-Verbrauch auch bei Bezug auf das Trockengewicht nicht so weit unter der Kontrolle liegen wie bei den Kulturen in den Atmungströgen. In

Tabelle 1. *Aminosäureausscheidung von Maiswurzeln.*
Die Anzahl der + entspricht dem relativen Mengenverhältnis. 0 = Spur.

	3 Tage	5 Tage	8 Tage	
Asparaginsäure . .	—	0	+	Kontrolle
	—	—	+	10^{-9} M IES
	—	—	—	10^{-5} M IES
Asparagin	—	—	—	
	—	—	—	
	—	—	—	
Glutamin	0	++	+++	
	0	++	+++	
	—	—	—	
Serin	0	++	+++	
	—	++	+++	
	—	—	—	
Alanin	—	+++	++++	
	—	++	++++	
	—	—	—	
Valin	—	—	0	
	—	—	0	
	—	—	—	
Leucin	—	—	0	
	—	—	0	
	—	—	—	

Abb. 14 sind sowohl ${}_{N}Q_{O2}$ als auch ${}_{Tr}Q_{O2}$ in Abhängigkeit von der IES-Konzentration nach 4tägiger Kulturdauer dargestellt. Dabei sind auch einige Versuchsreihen mit 10^{-4} M verwertet, die in den übrigen Abbildungen nicht enthalten sind, da sie den Kulturen mit 10^{-5} M weitgehend entsprechen. Aus dieser Gegenüberstellung wird besonders klar, wie wichtig es ist, verschiedene Bezugsgrößen anzuwenden, bevor man ein abschließendes Urteil fällt. Zweifellos hemmen starke IES-Konzentrationen zunächst die O_2-Aufnahme, wie Abb. 13 zeigt, aber nach einiger Kulturdauer ist zwar der O_2-Verbrauch in bezug auf das Trockengewicht noch erniedrigt, auf den Stickstoffgehalt jedoch erhöht.

Charakteristisch ist auch das Verhalten des RQ. Wie ebenfalls Abb. 14 zeigt, steigt er mit zunehmender IES-Konzentration an und erreicht bei 10^{-5} M sein Maximum. Mit der Beeinflussung der O_2-Aufnahme geht also eine Verschiebung des Verhältnisses Dekarboxylierung/Oxydation einher. Da das Ausgangsmaterial für die Atmung nur Glucose sein konnte, die bei vollständigem Abbau einen RQ von 1,0 ergibt, müssen unter der Einwirkung der IES mehr stark hydrierte Produkte entstehen als in den normalen Wurzeln. Die Nitratreduktion kann nicht als Ursache herangezogen werden, da der Stickstoffeinbau absolutgesehen gerade in den ersten Kulturtagen geringer ist als bei der Kontrolle. Über die

Natur dieser hydrierten Stoffe können zunächst noch keine Angaben gemacht werden.

e) Der synthetische Wirkungsgrad isolierter Maiswurzeln. Kürzlich wurde eine Methode mitgeteilt, wie man auch bei in vitro kultivierten

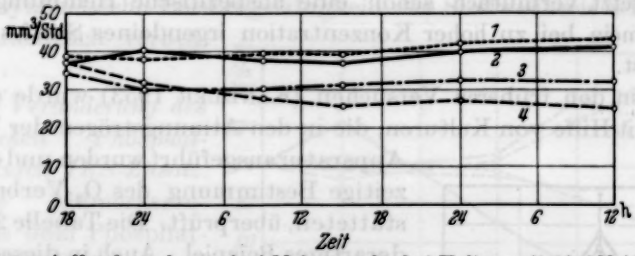


Abb. 13. Sauerstoffverbrauch von je 4 Maiswurzeln, bei Kultur mit 10^{-4} M (*4*), 10^{-7} M (*3*) 10^{-9} M (*1*) und ohne IES (*2*).

Organen und Pflanzen eine Stoffbilanz aufstellen kann (KANDLER 1953). Als Ausdruck für die synthetische Leistungsfähigkeit wurde dabei der Quotient „assimilierte Glucose/veratmete Glucose" vorgeschlagen und mit dem Ausdruck „Synthetischer Wirkungsgrad" (SW) bezeichnet, der auch im folgenden benützt wird. Bei den gleichen Kulturen, von denen bisher Längenwachstum, Trockengewicht

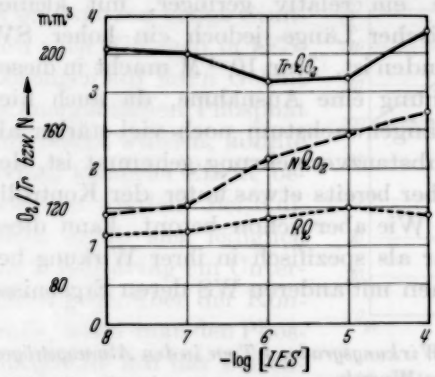


Abb. 14. Sauerstoffverbrauch und RQ nach 4tägiger Kulturdauer. *n* für alle Proben zwischen 6 und 8.

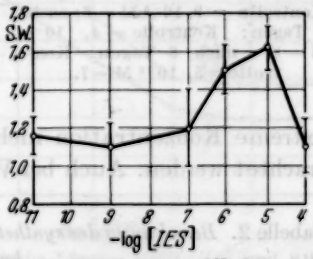


Abb. 15. Synthetischer Wirkungsgrad von 4 Tagen kultivierten Maiswurzeln. *n* bei allen Proben zwischen 8 und 12.

und Stickstoffeinbau dargestellt wurden, konnte auch der Glucoseverbrauch ermittelt werden. Die Trockengewichtszunahme, vermindert um die aus Nitrat reduzierte Stickstoffmenge und den Ascheanteil, vermehrt um die Ausscheidung und um 10% des Trockengewichtes (Austritt von H_2O bei der Kondensation von Glucose oder Aminosäuren), ergibt dann die assimilierte Glucose. Diese vom Gesamtglucoseverbrauch abgezogen, liefert den Wert für die veratmete Glucose.

Führt man diese Berechnung aus, so ergeben sich die in Abb. 15 dargestellten Werte. Bereits aus dem bei 10^{-5} M IES vermindertem

O_2-Verbrauch ging hervor, daß für den Aufbau der Wurzelsubstanz weniger Atmungsmaterial verbraucht wird. Dementsprechend steigt auch der SW mit zunehmender IES-Konzentration an. Bei 10^{-4} M ist allerdings wieder ein Abfall zu verzeichnen. Bei dieser Konzentration setzt vermutlich schon eine unspezifische Hemmung ein, wie sie allgemein bei zu hoher Konzentration irgendeines Stoffes zu beobachten ist.

Wie in den früheren Versuchen (Kandler 1953) wurde die Stoffbilanz mit Hilfe von Kulturen, die in den Atmungströgen der Warburg-Apparatur ausgeführt wurden und die gleichzeitige Bestimmung des O_2-Verbrauchs gestatteten, überprüft. Die Tabelle 2 zeigt ein derartiges Beispiel. Auch in diesem Fall ergibt sich eine beträchtliche Verbesserung des SW bei Zusatz von 10^{-5} IES. Bringt man den SW in Verbindung mit der spezifischen Länge, so ergibt sich wie bei dem früher besprochenen Beispiel (Kandler 1953), daß mit einer großen spezifischen Länge ein relativ geringer, mit kleiner spezifischer Länge jedoch ein hoher SW verbunden ist. Nur 10^{-4} M macht in dieser Beziehung eine Ausnahme, da auch hier das Längenwachstum noch viel stärker als die Substanzvermehrung gehemmt ist, der SW aber bereits etwas unter der Kontrolle liegt. Wie aber schon betont, kann diese extreme Konzentration nicht mehr als spezifisch in ihrer Wirkung betrachtet werden. Auch bei Versuchen mit anderen WS deren Ergebnisse

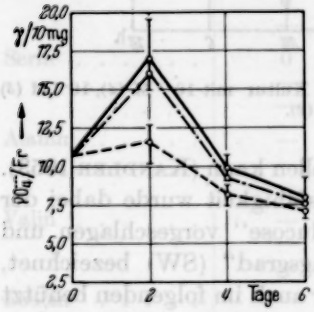


Abb. 16. Anorganisches Phosphat pro Frischgewicht nach verschiedener Kulturdauer bei 10^{-5} (····), 10^{-4} (— · — · —) und ohne IES (———). *n* nach 2 Tagen: Kontrolle = 9, 10^{-5} M = 8; nach 4 Tagen: Kontrolle = 4, 10^{-5} M = 8, nach 6 Tagen: Kontrolle = 5, 10^{-5} M = 7.

Tabelle 2. *Berechnung des synthetischen Wirkungsgrades 4 Tage in den Atmungströgen kultivierter Wurzeln.*

	Kontrolle	10^{-5} M IES
Gemessener O_2-Verbrauch	3900 mm³	2840 mm³
RQ	1,1	1,35
Absolutes Trockengewicht	13,7 mg	15,4 mg
Trockengewichtszunahme	9,5 mg	11,2 mg
N-Zunahme	0,200 mg	0,165 mg
Gesamter Glucoseverbrauch	16,0 mg	16,3 mg
Glucoseeinbau	9,8 mg	11,6 mg
CO_2-Produktion	4300 mm³	3800 mm³
Veratmete Glucose	6,2 mg	4,7 mg
Veratmete Glucose (errechnet aus der CO_2-Produktion)	5,65 mg	5,0 mg
Glucoseeinbau/veratmeter Glucose	1,58:1	2,5:1
Glucoseeinbau/veratmete Glucose (errechnet aus der CO_2-Produktion)	1,73:1	2,3:1

demnächst veröffentlicht werden sollen, zeigte sich dieser Sachverhalt. Die Berücksichtigung des SW als weiterer physiologischen Größe ergab ebenfalls, daß die das Längenwachstum hemmenden Konzentrationen einfach als wachstumshemmend bezeichnet werden können, denn die nicht synthetische Leistungsfähigkeit des Stoffwechsels wird zweifellos beträchtlich verbessert.

f) Die Veränderung des anorganischen Phosphatspiegels durch IES-Zusatz. Besondere Aufmerksamkeit wurde dem Phosphathaushalt gewidmet, nachdem die Arbeiten von Bonner einen Zusammenhang zwischen IES und Phosphataseaktivität wahrscheinlich machten. In Kurzversuchen, bei denen Wurzelspitzen einige Stunden nach Einlegen in IES-Lösungen auf ihren Gehalt an anorganischem Phosphat untersucht wurden, konnte jedoch keinerlei Effekt beboachtet werden. Bei Kulturen ergab sich lediglich am 2. Kulturtag ein Unterschied gegenüber der Kontrolle, wenn man den Phosphatgehalt auf das Frischgewicht bezieht, wie Abbildung 16 zeigt. Die mit 10^{-5} M behandelten Wurzel zeigen hier einen viel geringeren Phosphatgehalt als die Kontrollen. Dies widerspricht den Befunden von Bonner, der einen Anstieg des anorganischen Phosphats bei Einwirkung von 10^{-5} M IES fand. Der Widerspruch erklärt sich vielleicht aus der unterschiedlichen Zeitdauer der Versuche, wie eigene Versuche an *Avena*-Koleoptilen wahrscheinlich machen. Hier konnte in den ersten Stunden ebenfalls eine Zunahme beobachtet werden, der dann nach etwa 12 Std eine Abnahme folgte. Allerdings bedürfen diese Untersuchungen noch weiterer Bestätigung und sollen erst später, wenn weiteres Material vorliegt, eingehender dargestellt werden. Eine Beeinflussung des Phosphathaushaltes scheint aber auf jeden Fall vorzuliegen.

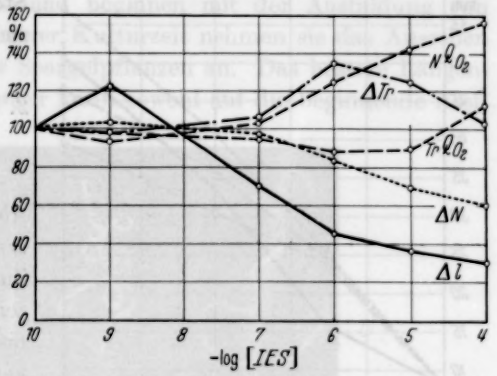


Abb. 17a. Längen-, Trockengewicht- und Stickstoffzunahme, sowie Qo_2 in Prozent der Kontrolle.

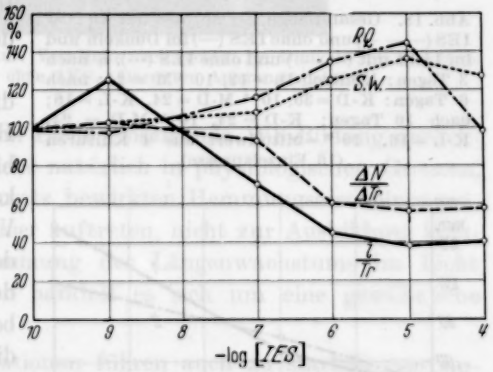


Abb. 17b. Spezifische Länge, N/Tr., RQ und SW in Prozent der Kontrolle.

g) Zusammenfassende Darstellung der IES-Wirkung auf isolierte Wurzeln. Stellt man die gewonnenen Daten in Prozent der Kontrolle dar, so ergibt sich abschließend das in den Abb. 17a und 17b dargestellte Bild. Es zeigt, daß die IES nicht nur das Längenwachstum, sondern auch den gesamten übrigen Stoffwechsel in Mitleidenschaft zieht.

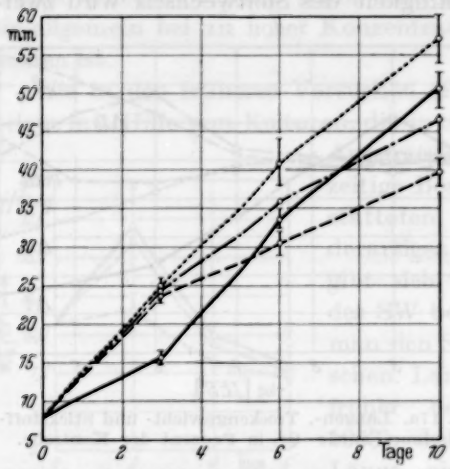


Abb. 18. Gesamtlänge der Sprosse mit 10^{-5} M IES (— — —) und ohne IES (—) im Dunkeln und im Licht mit (— · —) und ohne IES (···). *n* nach 3 Tagen: Kontroll-D. = 12, 10^{-5} M = 24; nach 6 Tagen: K-D = 30, 10^{-5} M-D = 24, K-L = 16; nach 10 Tagen: K-D = 24, 10^{-5} M-D = 24, K-L = 16. 10^{-5} = Mittelwert aus 4 Kulturen (16 Einzelsprosse).

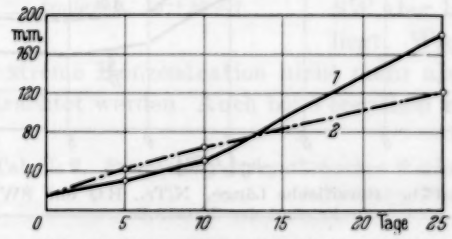


Abb. 19. Gesamtlänge belichteter (*1*) und verdunkelter (*2*) Sprosse.

2. *Untersuchungen an isolierten Spargelsprossen.*

a) Das Längenwachstum in Abhängigkeit von der IES-Konzentration und der Belichtung. Zunächst war wiederum ein Konzentrationsbereich von 10^{-5} M bis 10^{-11} M auf seine Wirksamkeit geprüft worden. Aber nur die stärksten Konzentrationen 10^{-5} M und 10^{-6} M ergaben in den ersten Tagen eine kräftige Längenwachstumsförderung, die nach 4 bis 5 Tagen in eine Hemmung überging. Bei allen hier dargestellten Versuchen kam daher nur mehr 10^{-5} M zur Verwendung. Außerdem wurde der Belichtung nunmehr besondere Beachtung geschenkt und bei allen Versuchsreihen stets die Hälfte der Ansätze mit einer 100-Watt-Lampe belichtet. Die Gesamtlänge der Sprosse nach 3, 6 und 10 Tagen gibt die Abb. 18 wieder.

Die Dunkelkulturen ohne IES zeigen in den ersten Tagen ein im Vergleich zu den späteren Kulturabschnitten geringeres Längenwachstum, als ob sie sich von der Schädigung bei der Isolierung oder durch den Bedingungswechsel erst langsam erholen müßten. Dann setzten sie das Wachstum lange Zeit hindurch, vermutlich sogar unbegrenzt, mit etwa gleicher Wachstumsrate fort (Abb. 19). Demgegenüber setzt bei den mit IES behandelten und den belichteten Sprossen sofort ein kräftiges Längenwachstum ein, das bei den mit IES behandelten aller-

dings bald unter die Kontrollwerte sinkt. Die belichteten Sprosse behalten ihren Vorsprung noch einige Zeit bei, obwohl die Zuwachsraten, wie aus der Parallelität der Kurven hervorgeht, schon nach 6 Tagen auf die der Dunkelkulturen abgesunken sind, liegen aber nach 3 Wochen (Abb. 19) weit unter diesen. Zu diesem Zeitpunkt sind die belichteten Sprosse vollkommen ergrünt und beginnen mit der Ausbildung von Flachsprossen. Bei noch längerer Kulturzeit nehmen sie das Aussehen normaler Stämmchen junger Spargelpflanzen an. Das bessere Längenwachstum zu Beginn der Kultur kann sowohl auf die beginnende Assi-

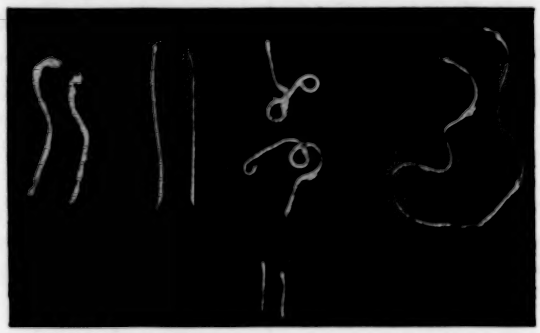


Abb. 20. Sprosse nach 4tägiger Kultur. Von links nach rechts: Im Dunkeln mit und ohne IES; im Licht mit und ohne IES. Darunter Ausgangszustand.

milation als auch auf eine im Licht einsetzende WS-Bildung zurückgeführt werden. Letztere bliebe natürlich in physiologischen Grenzen, so daß die durch den IES-Zusatz bewirkten Hemmungserscheinungen, wie sie bei längerer Kulturdauer auftreten, nicht zur Ausbildung kommen. Bei der späteren Hemmung des Längenwachstums im Licht gegenüber den Dunkelproben handelt es sich um eine gewöhnliche Etiolementsverhinderung.

Die hohen IES-Konzentrationen führen auch zu starken morphologischen Deformationen, wie die Abb. 20 zeigt. Die Sprosse sind verkrümmt und verdickt. Im Gegensatz zu den sehr einheitlich gerade wachsenden Sprossen in den Dunkelkulturen weisen auch die ohne IES-Zusatz im Licht kultivierten Sprosse immer in den ersten Kulturtagen Verkrümmungen auf, die bei IES-Zusatz extrem gesteigert sind.

b) Das Trockengewicht isolierter Spargelsprosse in Abhängigkeit von IES-Zugabe und Belichtung. Entsprechend dem Längenwachstum ist auch der Substanzeinbau in den ersten 3 Tagen geringer als später, wie die Abb. 21 zeigt. Sowohl IES-Zusatz als auch Belichtung führen zu stark erhöhter Trockengewichtszunahme, wobei die Kombination von IES und Belichtung die höchsten Werte ergibt. Wie bei den Wurzeln, verhalten sich auch bei den Sprossen Längenwachstum und Substanz-

vermehrung entgegengesetzt, wenn man die späteren Kulturabschnitte ins Auge faßt.

Einen deutlichen Einfluß übte die IES auf die Chlorophyllbildung aus. Die mit IES behandelten Sprosse ergrünten deutlich später und blieben heller. Erst nach mehreren Wochen traten auch an diesen Sprossen Seitensprosse auf, die ganz normal ergrünten, gleichzeitig aber auch keine Verkrümmungen mehr zeigten. Wie die Abb. 5 bereits zeigte, sinkt der IES-Gehalt der Lösungen bei Belichtung sehr stark ab, so daß dieser Rückgang der IES-Wirkung darauf zurückgeführt werden kann. Es kann sich aber auch um ein ähnliches Phänomen handeln, wie es bereits bei den Wurzelkulturen besprochen wurde.

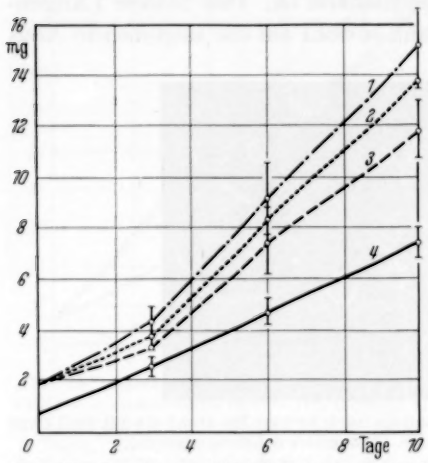


Abb. 21. Trockengewicht bei Kultur mit 10^{-5} M (*3*) und ohne IES im Dunkeln (*4*), mit 10^{-5} M (*1*) und ohne IES im Licht (*2*). *n* nach 3 Tagen: (*4*) = 6, (*3*) = 6, (*1*) = 5; nach 6 Tagen: (*4*) = 9, (*3*) = 7, (*1*) = 8; nach 10 Tagen: (*4*) = 8, (*3*) = 9, (*1*) = 3.

Um die zunächst rein visuell festgestellte Verminderung des Chlorophyllgehaltes auch zahlenmäßig belegen zu können, wurden bei einigen Proben die Sprosse mit Methanol extrahiert und die gefundenen Extinktionswerte in Tabelle 3 zusammengestellt. Der aus je 5 Sprossen gewonnene Extrakt wies bei den Kontrollen insgesamt eine stärkere Extinktion auf als bei den IES-Proben. Wesentlich größere Unterschiede ergeben sich, wenn man die Extinktion nicht auf die ganzen Sprosse, sondern auf das Frischgewicht bezieht, das bei den IES-Proben erheblich höher liegt als bei den Kontrollen. Zweifellos wird die Chlorophyllsynthese gegenüber dem übrigen Stoffwechsel benachteiligt.

c) Der Stickstoffhaushalt isolierter Spargelsprosse in Abhängigkeit von IES und Belichtung. Ähnlich, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei den Wurzeln, führt eine hohe IES-Konzentration anfänglich zu einer

Tabelle 3. *Relativer Chlorophyllgehalt bei Kultur mit und ohne IES.*

Zeit	Chlorophyllextinktionswerte					
	ohne IES	mit 10^{-5} M IES	ohne IES	mit 10^{-5} M IES	ohne IES	mit 10^{-5} M 8
	Absolutwerte 100 mg Frischgewicht				% der Kontrolle	
8 Tage . . .	0,190	0,130	0,025	0,096	100	47
14 Tage . . .	0,475	0,360	0,231	0,174	100	75

Verminderung, später jedoch zu einer Erhöhung des Gesamtstickstoffgehaltes (Abb. 22). Entsprechend wirkt auch die Belichtung. Beide

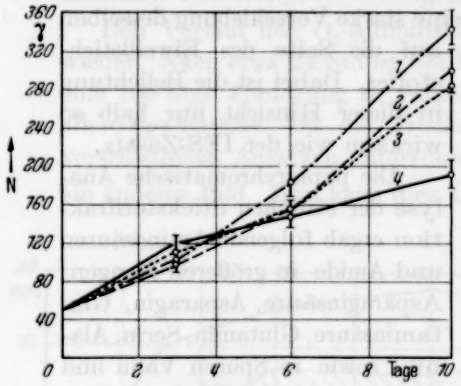


Abb. 22.

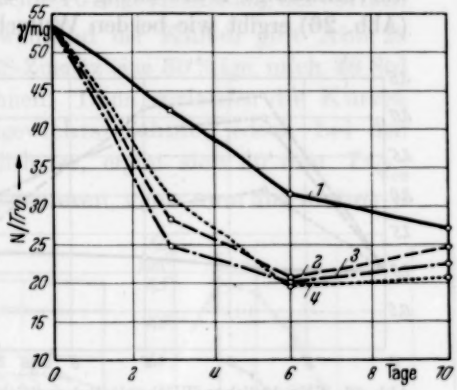


Abb. 23.

Abb. 22. Gesamtstickstoff bei Kultur im Dunkeln mit 10^{-5} M (*2*) und ohne IES (*4*), sowie im Licht mit 10^{-5} M (*1*) und ohne IES (*3*). *n* nach 3 Tagen: (*4*) = 4, (*2*) = 7; nach 6 Tagen: (*4*) = 8, (*2*) = 8, (*3*) = 10; nach 10 Tagen: (*4*) = 7, (*2*) = 7, (*3*) = 4.

Abb. 23. Gesamtstickstoff/Milligramm Trockengewicht bei Kultur im Dunkeln mit 10^{-5} M (*2*) und ohne IES (*1*), sowie im Licht mit 10^{-5} M (*3*) und ohne IES (*4*).

Wirkungen addieren sich wie im Falle des Trockengewichtes. Betrachtet man den in Abb. 23 dargestellten Quotienten N/Trockengewicht, so wird wiederum die Verschiebung dieses Quotienten zugunsten des

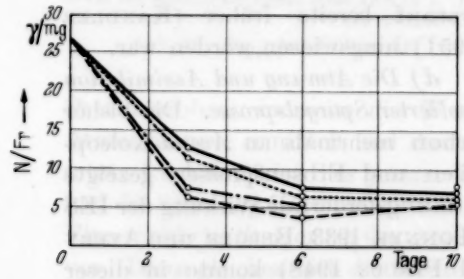


Abb. 24.

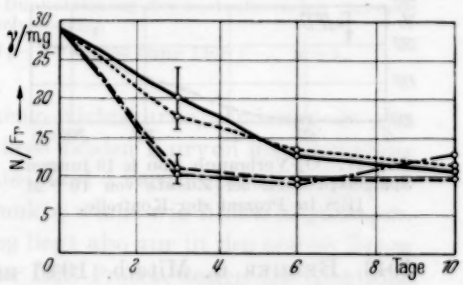


Abb. 25.

Abb. 24. TES-löslicher Stickstoff/Milligramm Frischgewicht. Bei Kultur im Dunkeln mit 10^{-5} M (— — —) und ohne IES (——), sowie im Licht mit 10^{-5} M (— · —) und ohne IES (····). *n* bei allen Ansätzen zwischen 3 und 4.

Abb. 25. TES-unlöslicher Stickstoff/Frischgewicht. Signaturen wie bei Abb. 24.

Trockengewichtes deutlich. Bei längerer Kulturdauer gleichen sich die Differenzen wieder mehr aus.

Die Aufgliederung des organischen Gesamtstickstoffes in eine TES-lösliche und TES-unlösliche Fraktion führte zu den in den Abb. 24 und 25 dargestellten Ergebnissen. Durch IES wird die lösliche Fraktion in

den ersten Tagen stark vermindert, während das Licht nur einen geringen Einfluß ausübt. Das gleiche gilt für die Eiweißfraktion. Die kurvenmäßige Darstellung des Quotienten löslicher N/unlöslicher N (Abb. 26) ergibt wie bei den Wurzeln eine starke Verschiebung desselben auf die Seite des Eiweißstickstoffes. Dabei ist die Belichtung in dieser Hinsicht nur halb so wirksam wie der IES-Zusatz.

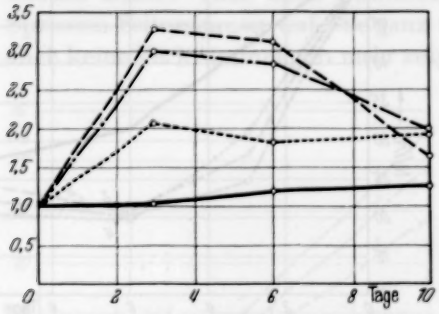


Abb. 26. TES-löslicher/TES-unlöslicher Stickstoff bei Kultur im Dunkeln und im Licht mit und ohne IES. Signaturen wie in Abb. 24.

Die papierchromatische Analyse der löslichen Stickstofffraktion ergab folgende Aminosäuren und Amide in größeren Mengen: Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin, Serin, Alanin, sowie in Spuren Valin und Leucin. Die verschiedenen Versuchsansätze zeigten qualitativ keine Unterschiede. Dagegen ergaben sich kleinere quantitative Verschiebungen bei IES-Zusatz oder Belichtung, wie bereits aus dem Verhalten der TES-löslichen Stickstofffraktion zu entnehmen war. Besonders Serin und Alanin waren nach 10tägiger Kultur gegenüber der Kontrolle etwas erhöht. Aminosäureausscheidung in die Nährlösung ließ sich bei IES-Zusatz ebensowenig nachweisen wie bei den Kontrollen, worauf bereits früher (Kandler 1951) hingewiesen worden war.

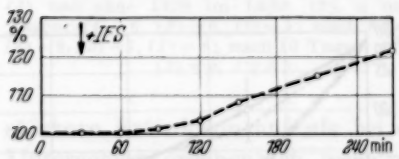


Abb. 27. O_2-Verbrauch von je 10 jungen Spargelsprossen bei Zusatz von 10^{-5} M IES in Prozent der Kontrolle.

d) Die Atmung und Assimilation isolierter Spargelsprosse. Die bisher schon mehrmals an *Avena*-Koleoptilen und Erbsensprossen gezeigte atmungsfördernde Wirkung der IES (Bonner 1933, Berger unn Avery 1943, Berger u. Mitarb. 1946 und Pincus 1948) konnte in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt und auch bei Spargelsprossen gezeigt werden. Vorversuche mit *Avena*-Koleoptilen ergaben in Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur bereits nach 2 Std eine 15%ige, nach 3 Std eine 30%ige Atmungssteigerung bei Einwirkung von 10^{-5} M IES. Ein ähnlicher Effekt ließ sich auch bei Spargelsprossen nachweisen, wie aus Abb. 27 hervorgeht. In diesem Falle wurden 10 mm lange Sproßspitzen verwendet, die in 1% Glucose enthaltendem m/45 Phosphatpuffer von p_H = 5,4 schwammen. Der einzige Unterschied gegenüber *Avena*-Koleoptilen bestand in der langsameren Wirkung. Im übrigen war sie ebenfalls von der Glucosezufuhr abhängig. Ohne dieselbe ergab sich wie

bei den *Avena*-Koleoptilen keine Förderung der Atmung. Die Überprüfung eines größeren Konzentrationsbereiches ergab, daß 10^{-5} M maximale Förderung, 10^{-3} M dagegen eine 10%ige Hemmung hervorruft.

Den Verlauf der O_2-Aufnahme während der Kultur gibt Abb. 28 wieder. Nach etwa 24 Std ist bei IES-Zusatz eine 50%ige, nach 48 Std eine 100%ige Förderung zu verzeichnen. Dann verlaufen die Kurven allerdings parallel. Da die Trockengewichtszunahme jedoch bei den verschiedenen Ansätzen unterschiedlich ist, ergibt sich für den $Tr_{Q_{O_2}}$ ein anderes Bild. Man kann dies konstruieren, wenn man aus mehreren

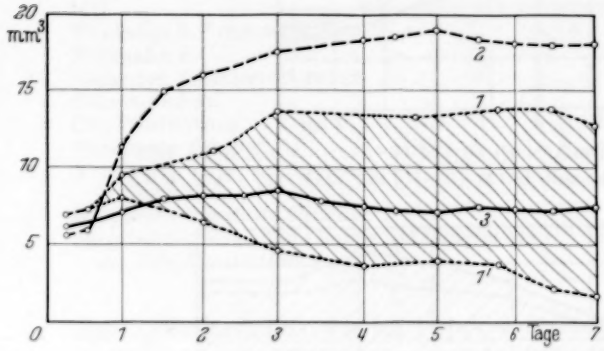


Abb. 28.

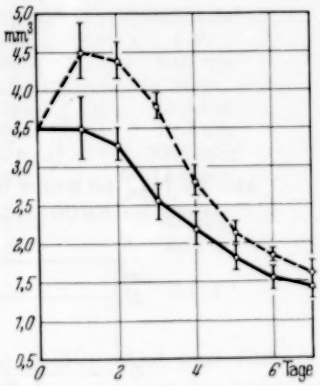


Abb. 29.

Abb. 28. O_2-Verbrauch je Stunde bei Kultur im Dunkeln mit 10^{-5} M (*2*) und ohne IES (*3*), sowie bei Kultur im Licht ohne IES (*1'*). *1* = Dunkelatmung der assimilierenden Sprosse. (Typischer Einzelversuch.)

Abb. 29. $Tr_{Q_{O_2}}$ bei Kultur mit 10^{-5} M (– – –) und ohne IES (—). $n = 4$.

Parallelproben einerseits die Trockengewichtskurve, andererseits die Atmungskurve ermittelt und dann diese beiden Kurven ins Verhältnis setzt. In Abb. 29 ist dies getan. Dabei sind 5 Parallelproben verwertet und die Streuung für die einzelnen Punkte wurde wie üblich angetragen. Eine wirkliche Steigerung der Atmung liegt also nur in den ersten Tagen vor. Dann gleichen sich die Werte der IES-Proben denen der Kontrolle an. Die Parallelität mit dem Verhalten des Längenwachstums ist auffällig. Auch dieses erfuhr nur in den ersten 3 Tagen eine Förderung, schlug dann aber in eine Hemmung um.

Eine gleichzeitige Bestimmung von O_2-Verbrauch und Photosynthese ist natürlich nicht möglich und so wurde bei den belichteten Sprossen in Abständen von 24 Std jeweils für einige Stunden verdunkelt und angenommen, daß der in diesem Zeitraum bestimmte O_2-Verbrauch als Dunkelatmung angesetzt werden darf. In Abb. 28 sind zu den Kurven für den O_2-Verbrauch von Dunkelkulturen auch die Kurven für den O_2-Verbrauch einer belichteten Kultur eingezeichnet. Die schraffierte

Fläche zwischen den Kurven für die Dunkelatmung und dem O_2-Verbrauch während der Belichtung (der Kompensationspunkt wurde bei der gewählten Lichtintensität nie erreicht) stellt die Photosyntheseleistung dar. Die Erhöhung der Dunkelatmung belichteter Sprosse gegenüber der Atmung der in Dunkelheit kultivierten Sprosse geht dem

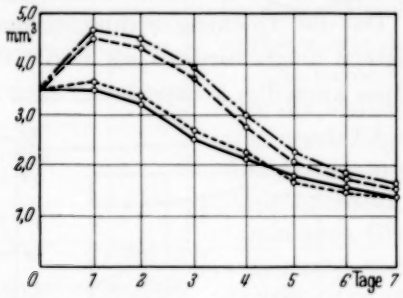


Abb. 30. Tr_{O_2} bei Kultur im Dunkeln mit 10^{-5} M IES (— — —) und ohne IES (———), sowie bei Kultur im Licht mit 10^{-5} M (— · —) und ohne IES (·····). $n = 4$.

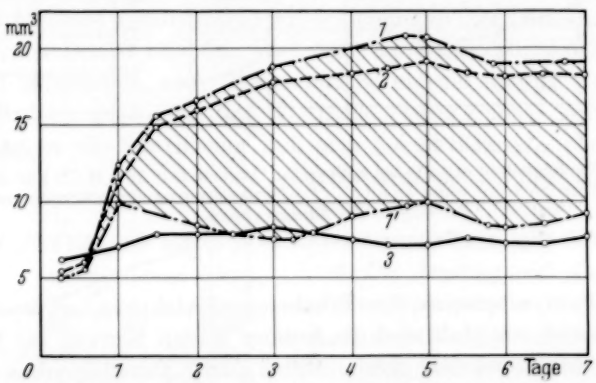


Abb. 31. O_2-Verbrauch je Stunde bei Kultur im Licht mit 10^{-5} (*1'*; *1* = Dunkelatmung). (*2*) und (*3*) entsprechend Abb. 28. (Typischer Einzelversuch.)

vermehrten Substanzeinbau parallel, wie aus Abb. 30 hervorgeht. Bei Bezug auf das Trockengewicht verschwindet die Atmungssteigerung fast vollständig.

Die Verhältnisse für Belichtung + IES-Zusatz gibt die Abb. 31 wieder. Daraus wird besonders deutlich, daß die IES wirklich zu einer Atmungssteigerung führt, denn beide Kurven für die belichteten Sprosse werden gleichmäßig gehoben. Das bedeutet aber auch, daß die Photosyntheseleistung gleichbleibt. Der geringere Chlorophyllgehalt tritt hier nicht in Erscheinung, da sich das Licht offensichtlich im Minimum befindet. Dieser Befund bedeutet daher auch keinen direkten Gegensatz zu den Beobachtungen FREELANDS (1949), der bei Bohnenpflanzen nach

Besprühen mit IES eine Hemmung der Photosynthese fand. Dabei wurde mit normalem Sonnenlicht gearbeitet, so daß sich eine Verminderung des Chlorophyllgehaltes stark bemerkbar machen mußte.

Bezieht man den O_2-Verbrauch der belichteten und IES-behandelten Sprosse ebenfalls auf Trockengewicht, so zeigt sich die gleiche Erhöhung

Tabelle 4. *Berechnung des synthetischen Wirkungsgrades 7 Tage in den Atmungströgen kultivierter Sprosse.*

	Kontrolle	10^{-5} M IES
Gemessener O_2-Verbrauch	1740 mm³	2650 mm³
RQ	1,0	1,15
Trockengewichtszunahme	4,8 mg	10,5 mg
N-Zunahme	103 γ	96 γ
Gesamter Glucoseverbrauch	7,7 mg	15,2 mg
Glucoseeinbau	4,8 mg	10,8 mg
CO_2-Produktion	1740 mm³	3050 mm³
Veratmete Glucose	2,9 mg	4,4 mg
Veratmete Glucose (errechnet aus der CO_2-Produktion)	2,3 mg	4,0 mg
Eingebaute/veratmete Glukose	*1,65:1*	*2,45:1*
Eingebaute/veratmete Glucose, (errechnet aus der CO_2-Produktion.)	2,06:1	2,7:1

des O_2-Verbrauches wie bei Dunkelkulturen (Abb. 30). Auf eine Umrechnung des O_2-Verbrauches auf den Stickstoffgehalt der Sprosse kann verzichtet werden, da sich nur eine noch stärkere Steigerung ergeben würde und nicht wie bei den Wurzeln eine Umkehrung der Verhältnisse. Der RQ war bei 10^{-5} M um 15—20% gegenüber der Kontrolle erhöht.

Tabelle 5. *Synthetischer Wirkungsgrad der in Erlenmeyerkölbchen kultivierten Sprosse. n = 8—12.*

t	Kontrolle	10^{-5} M IES
3 Tage	0,4 ± 0,045	0,29 ± 0,028
6 Tage	0,65 ± 0,11	0,86 ± 0,16
10 Tage	0,72 ± 0,18	1,10 ± 0,1

e) Der „Synthetische Wirkungsgrad" isolierter Sprosse in Abhängigkeit von der IES-Konzentration. Aus den in den Atmungströgen der Warburg-Apparatur ausgeführten Kulturen ließ sich wie bei den Wurzeln der SW errechnen, wovon Tabelle 4 ein Beispiel zeigt. Auch hier bewirkt der IES-Zusatz zweifellos eine Erhöhung der Syntheseleistung. Dies geht auch bei der Berechnung des SW aus den in Erlenmeyerkölbchen ausgeführten Versuchen hervor. Bereits vor kurzem (Kandler 1953) war auf die starke Zeitabhängigkeit des SW von Sprossen hingewiesen worden. Sie zeigt sich auch bei den unter IES-Einwirkung kultivierten Wurzeln, wie sich aus Tabelle 5 ergibt. Dabei liegt der SW in den ersten Tagen, in denen eine Förderung des Längenwachstums bewirkt wird, unter der Kontrolle, später, entsprechend der Hemmung des

Längenwachstums, darüber. Für die Wurzeln war schon ein derartiger Zusammenhang zwischen Längenwachstum und SW vermutet worden (Kandler 1953), und diese Beobachtung liegt durchaus in der gleichen Richtung.

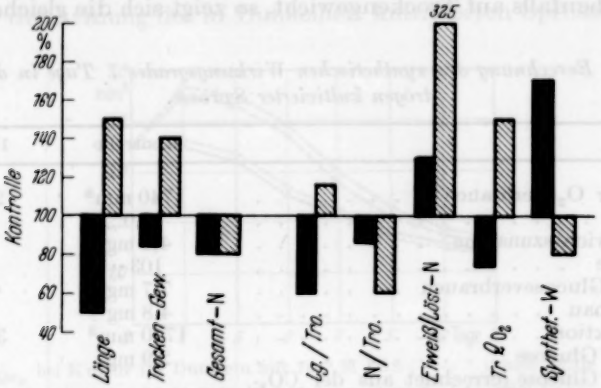


Abb. 32. Versuchsergebnisse bei 2 Tage unter 10^{-5} M IES-Zusatz kultivierten Maiswurzeln, bzw. 3 Tage entsprechend kultivierten Sprossen in Prozent der Kontrolle dargestellt. ■ Wurzeln, ▯ Sprosse.

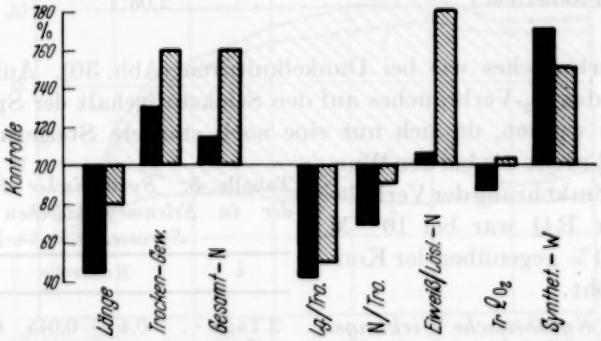


Abb. 33. Entsprechende Darstellung wie in Abb. 32, aber nach 7- bzw. 10tägiger Kulturdauer.

f) Gegenüberstellung des Verhaltens von Wurzel und Sproß bei Einwirkung von 10^{-5} IES. Der vielfach beschriebene Gegensatz in der Reaktivität von Wurzel und Sproß gegenüber den Streckungswuchsstoffen konnte in vorliegender Arbeit nur in den ersten 3 Tagen beobachtet werden. Später ergaben sich für beide Organe die gleichen stoffwechselphysiologischen Veränderungen im Gefolge der IES-Einwirkung. In den Abb. 31 und 32 ist diese Tatsache veranschaulicht.

IV. Diskussion der Ergebnisse.

Aus den oben vorgelegten Daten geht hervor, daß die IES nicht nur das Streckungswachstum, sondern auch eine Reihe von Stoffwechsel-

vorgängen beeinflußt, und die neueren Vorstellungen, daß die IES ihre Wirkung auf das Wachstum überhaupt nur durch das Eingreifen in den Stoffwechsel auf Grund ihrer Co-Fermentnatur ausüben kann, wird dadurch weiter gestützt. Freilich gestatten die bisherigen Kenntnisse noch keinen Einblick in den eigentlichen Wirkungsmechanismus, doch kann bereits soviel gesagt werden, daß die IES an einem sehr zentralen Punkt des Stoffwechsels eingreifen muß, um so vielfältige Wirkungen auszulösen. Die Vermutung, daß dies der Phosphathaushalt sei, ist sehr verlockend. Bevor aber weitere Arbeitshypothesen aufgestellt werden, erscheint es geboten, möglichst eingehend auch die Wirkung anderer Stoffe mit WS-Charakter in ähnlicher Weise zu untersuchen, so daß allmählich ein möglichst vollständiges Bild von der stoffwechselphysiologischen Wirkung der WS entsteht. Arbeiten in dieser Richtung sind am hiesigen Institut im Gange, und demnächst sollen weitere Ergebnisse mitgeteilt werden. Aus diesem Grunde sei zunächst auf eine ausführlichere Diskussion dieser Arbeit verzichtet. Sie läßt sich mit dem später zu veröffentlichenden Material auf breiterer Basis durchführen.

Zusammenfassung.

1. Maiswurzeln und Spargelsprosse wurden unter Zusatz verschiedener Indolylessigsäure-Konzentrationen in Nährlösungen steril kultiviert und nach verschiedener Kulturdauer Länge, Trockengewicht, organischer Gesamtstickstoff, Sauerstoffverbrauch, anorganisches Phosphat und Glukoseverbrauch bestimmt. Durch Kultur in den Atmungströgen der Warburg-Apparatur war es möglich, sowohl Atmungsintensität bzw. Assimilationsleistung als auch den synthetischen Wirkungsgrad während des Wachstums zu ermitteln.

2. Das Längenwachstum der Wurzeln wurde durch 10^{-5} M gehemmt, das der Sprosse in den ersten 3 Tagen gefördert, dann ebenfalls gehemmt. 10^{-9} M führte bei den Wurzeln zu einer schwachen Förderung des Längenwachstums.

3. Das Trockengewicht der Wurzeln wurde durch 10^{-5} M zunächst schwach erniedrigt, nach 7tägiger Kulturdauer liegt es aber über der Kontrolle. Bei den Sprossen bewirkte 10^{-5} M von Anfang an eine starke Erhöhung des Trockengewichtes (bis zu 60%).

4. Die Veränderungen im Stickstoffgehalt durch 10^{-5} M entsprachen sich bei Sproß und Wurzel. In den ersten Tagen lag der Stickstoffgehalt unter, dann über der Kontrolle. Das Verhältnis Stickstoff/Trockengewicht war auf die Seite des Trockengewichtes verschoben. Ebenfalls war der Quotient TES-löslicher Stickstoff/TES-unlöslicher Stickstoff

bei beiden Organen erniedrigt. Die Ausscheidung von Aminosäuren durch die Wurzeln wurde durch Zusatz von 10^{-5} M unterdrückt.

5. Der Sauerstoffverbrauch wird bei den Wurzeln durch 10^{-5} M zunächst gehemmt. Nach längerer Kulturdauer ergibt sich aber nur dann eine Hemmung, wenn man ihn auf das Trockengewicht, nicht aber, wenn man ihn auf den Stickstoffgehalt bezieht. Bei den Sprossen erfolgt in den ersten 3 Kulturtagen eine starke Förderung, die bei längerer Kultur abklingt. Der RQ ist sowohl bei den Wurzeln wie bei den Sprossen erhöht.

6. Belichtete Sprosse wiesen in ihrer Photosyntheseleistung keine Beeinflussung durch Indolylessigsäure auf. In mancher Hinsicht verhielten sich belichtete Sprosse gleich wie Indolylessigsäure-behandelte (Begünstigung des Kohlenhydrataufbaues gegenüber dem Stickstoffeinbau, Verschiebung des Verhältnisses löslicher N/unlöslicher N zugunsten des Eiweißes).

7. Der synthetische Wirkungsgrad wird durch 10^{-5} M verbessert, bei Sprossen allerdings nur nach längerer Kulturdauer. In den ersten 3 Tagen dagegen ist er niedriger.

Der deutschen Notgemeinschaft der Wissenschaften danken wir für die Bereitstellung von Geräten.

Literatur.

Berger, J., and G. S. Avery: Amer. J. Bot. **30**, 297 (1943). — Berger, J., P. Smith and G. S. Avery: Amer. J. Bot. **33**, 601 (1946). — Bertho, A., u. W. Grassmann: Biochemisches Praktikum. Berlin-Leipzig 1936. — Blank, E., u. A. Frey-Wyssling: Ber. schweiz. bot. Ges. **51**, 116 (1941). — Bonner, J.: J. Gen. Physiol. **17**, 63 (1933). — Bonner, J., and G. S. Wildman: Growth **11**, 51 (1947). — Bonner, W. D., and K. V. Thimann: Amer. J. Bot. **37**, 66 (1950). — Boysen-Jensen, P.: Ann. Rev. **7**, 514 (1938). — Bünning, E.: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanzen. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1948. — Christiansen, G. S., and K. V. Thimann: Arch. of Biochem. **26**, 230 (1950a); **26**, 248 (1950b); **28**, 117 (1950c); **29**, 354 (1950d). — Commoner, B., and K. V. Thimann: J. Gen. Physiol. **24**, 279 (1941). — Cramer, F.: Papierchromatographie. Weinheim 1952. — Dickens, F.: Die manometrische Methode. In Methoden der Fermentforschung von Bamann u. Myrbäck. Leipzig 1941. — Fiedler, H.: Z. Bot. **30**, 385 (1936). — Freeland, R. O.: Plant Physiol. **24**, 4 (1949). — Galston, A. W., and R. S. Baker: Amer. J. Bot. **36**, 773 (1949b); **38**, 190 (1951). — Galston, A. W., and M. E. Hand: Amer. J. Bot. **36**, 85 (1949a). — Gautheret, R.: Manuel Technique de Culture de Tissus Végétaux. Paris 1942. — Bull. Soc. Chim. biol. Paris **24**, 13 (1942). — C. r. Acad. Sci. Paris **226**, 270 (1948). — Geiger-Huber, M., u. E. Burlet: Jb. wiss. Bot. **84**, 233 (1937). — Gordon, S. A., and F. S. Nieva: Arch. of Biochem. **20**, 336 (1949). — Gustafson, F. G.: Plant Physiol. **21**, 49 (1946). — Guttenberg, H. v.: Wachstum und Bewegung. Fortschr. Bot. **12**, 323 (1949). — Kandler, O.: Z. Naturforsch. **5b**, 103 (1950); **6b**, 437 (1951). —

Planta (Berl.) **40**, 346 (1952). — Z. Naturforsch. 8b (1953). — KLEIN, G.: Handbuch der Pflanzenanalyse. Wien 1931. — KLINGMÜLLER, V.: Z. anal. Chem. **131**, 1 (1950). — KOTTE, W.: Beitr. allg. Bot. **2**, 413 (1922). — LANG, A.: Entwicklungsphysiologie. Fortschr. Bot. **12**, 340 (1940). — LODE, W.: VDI-Z. **90**, 89 (1948). — LOO, S. W.: Amer. J. Bot. **32**, 13 (1945). — MARTLAND, M., and R. ROBISON: Biochemic. J. **20**, 848 (1926). — MOREL, G.: C. r. Soc. Biol. Paris **141**, 280 (1947). OPPENORTH, W. F. F.: Rec. Trav. bot. néerl. **38**, 287 (1939). — PINCUS, G., and K. V. THIMANN: The Hormons. Physiology, Chemistry and Applications. New York 1948. — POLSEN, A., V. M. MOSLEY and G. WYKOFF: Science (Lancaster, Pa.) **105**, 603 (1947). — ROBBINS, W. J.: Bot. Gaz. **73**, 376 (1922). — SACHS, J.: Arb. bot. Inst. Würzburg **2**, 452 (1882). — SÖDING, H.: Die Wuchsstofflehre. Stuttgart 1952. — TANG, Y. W., and J. BONNER: Arch. of Biochem. **13**, 11 (1947). — THIMANN, K. V., and W. D. BONNER: Amer. J. Bot. **35**, 271 (1948); **36**, 214 (1949). — THIMANN, K. V., R. H. SLATER and G. S. CHRISTIANSEN: Arch. of Biochem. **28**, 117 (1950). — WHITE, P. R.: A Handbook of Tissue Culture. New York 1943.

Dr. OTTO KANDLER, München 38, Botanisches Institut, Menzinger Straße 67.

Planta Bd. 41, S. 642—645 (1953).

ÜBER DAS VERHALTEN EINZELNER ISOLIERTER PROTHALLIUMZELLEN UND DESSEN BEDEUTUNG FÜR KORRELATION UND REGENERATION.

Von

DIETER E. MEYER.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 19. Dezember 1952.)

Die Regenerationserscheinungen der Farnprothallien studierten GOEBEL (1877), ISABURO-NAGAI (1914), LINSBAUER (1926), ALBAUM (1938) u. a. — Zusammenfassend kann über die Regenerationsfähigkeit gesagt werden: beliebige Teilstücke können wieder voll funktionstüchtige Prothallien regenerieren. LINSBAUER gelang es, einzelne Zellen des Prothalliumfadens, d. h. des Stadiums zwischen keimender Spore und flächigem Prothallium, zu isolieren und zur Regeneration zu bringen. Ob auch eine einzelne isolierte Zelle des Prothalliumgewebes zur Regeneration befähigt sei, konnte LINSBAUER nicht mit Sicherheit entscheiden (1926, S. 86), da es sehr schwierig ist, auf mechanischem Wege eine einzelne Zelle herauszulösen, ohne sie zu töten. — In eigenen, aus anderen Gründen angelegten Prothalliumkulturen auf Agar wurden nun zahlreiche Zellen auf „biologische" Weise isoliert. Ein Pilz zerstörte die Prothallien; hierbei blieben aber einzelne Zellen am Leben (Abb. 1). Die befallenen Teile der Prothallien berührten den Agar, so daß die einzelnen überlebenden Zellen dem Substrat auflagen. Mit einer Glasnadel konnte man sie herausheben und auf frischen Agar übertragen. Hier wuchsen alle Zellen zu Prothallien aus, sofern sie nicht bald nach der Übertragung durch den Pilz oder Bakterien zugrunde gingen. — Beim Herausheben der Zellen ergab sich nun die überraschende Tatsache, daß der größte Teil dieser einzelnen, völlig isolierten Zellen schon von selbst Regenerate gebildet hatte, und zwar nach unten in den Agar hinein. Durch den ersten Teilungsschritt werden diese Zellen nicht halbiert, sondern die Mutterzelle bleibt als Restkörper zurück, an ihr entsteht eine Ausbuchtung, eine einzellige, kleinere Knospe, die das Leben weiter trägt. Der Vorgang ist aus Abb. 2B ersichtlich. Ähnlich bildet die keimende Spore eine Vorwölbung, die durch die erste Wand abgeteilt wird.

„. . . Regenerationserscheinungen kommen allgemein dadurch zustande, daß die bei den mechanischen Angriffen unverletzt und unbeschädigt gebliebenen Teile durch das Trauma zu Wachstumsleistungen besonderer Art angeregt werden" (KÜSTER 1951, S. 766). Es erscheint mir wahrscheinlicher, daß die oben dargelegten Regenerationsvorgänge anders zu deuten sind. Die Regeneration der einzelnen isolierten Zellen

ist eine Frage der Korrelation. Nicht Teilungsstoffe und Wundhormone veranlassen die Zelle, zu einem neuen Prothallium auszuwachsen, sondern es genügt allein die Isolation, der Fortfall der Hemmungen durch

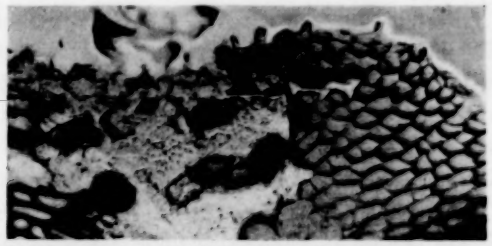


Abb. 1. Isolation einzelner Zellen von *Asplenium adiantum-nigrum* durch Pilzbefall des Prothalliumgewebes. Die isolierten Zellen haben stark gebräunte Membranen. Der Pilz konnte nicht näher bestimmt werden; vermutlich wird von ihm erst die Mittellamelle angegriffen (s. Pfeil).

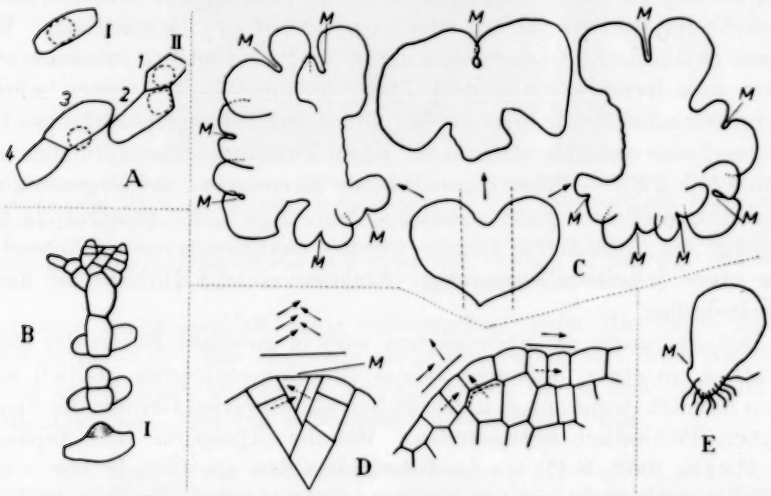


Abb. 2. A Die isolierten Zellen der Abb. 1. Die Kreise deuten die Ansatzstellen der Regenerate an die Mutterzellen an; sie sind auch in Abb. 1 zu erkennen. Zelle I beim Herausheben mit einer Ausbuchtung (B *I*); *II*, *1—3* beim Herausheben bereits mit mehrzelligen Prothallien; *4* ist tot. — B Zelle *I* (A) beim Herausheben (von der Seite), nach 6 und 14 Tagen auf frischem Agar (von unten). — C Erfolg des Drittelns eines Prothalliums von *Asplenium ruta-muraria* nach 3 Wochen. *M* Scheitelzelle. — D Teilungsweise von Scheitelzelle und Rand des Prothalliums. — E Asymmetrisches Prothallium mit nur einem Seitenlappen.

die Nachbarzellen, das Herauslösen der Zelle aus dem Korrelationszusammenhang. Daß am Farnprothallium Korrelationen im Sinne von Hemmungen das normale Geschehen regieren, ergibt eindeutig folgender Versuch (Abb. 2 C): Zerschneidet man Prothallien in 3 Teile derart, daß der mittlere die Scheitelzelle behält, so entstehen an den Rändern der Seitenlappen (die Schnittflächen ausgenommen) zahlreiche Scheitelzellen, die Adventivprothallien bilden; das Mittelstück mit der alten

Scheitelzelle wächst normal weiter. Eine ganze Petrischale, mit gedrittelten Prothallien belegt, zeigt dies Bild in erstaunlicher Regelmäßigkeit. Demnach: Die Scheitelzelle hemmt die Randzellen des Prothalliums daran, Scheitelzellen zu werden. Gerät sie in Fortfall, so erlaubt es das „Interregnum" gewissen — offensichtlich mitosebereiten — Zellen, ebenfalls Scheitelzellen zu werden. — Eine Randzelle unterscheidet sich von der Scheitelzelle durch die Richtung der Teilungsspindel, wenn eine Mitose durchgeführt wird. Bei der Randzelle liegt die Spindelachse senkrecht oder parallel zum Rand des Prothalliums, bei der Scheitelzelle schräg (Abb. 2D). Die Scheitelzelle beeinflußt also die Richtung der Teilungsspindelachsen im Prothallium. Diese Ansicht ist durch Versuche HEILBRONNS (1946) gesichert; nach Röntgenbestrahlung entstanden Prothallien ohne Scheitelzelle, die völlig regellos wuchsen. — Bei einer Scheitelzelle ändert die Teilungsspindelachse ihre Richtung von Teilung zu Teilung (Abb. 2D). Dieser rhythmische Wechsel ist die Ursache für die normale, herzförmige Gestalt des Prothalliums. Was dieses rhythmische Drehen verursacht, wird vielleicht zu erkennen sein, wenn man lernt, es zu stören. Daß dies möglich ist, deuten seltene, asymmetrische Prothallien an, bei denen die Teilungsspindelachse vorwiegend oder ausschließlich in der einen Richtung stehengeblieben sein muß (Abb. 2E). — Eine organbildende Korrelation, im Gegensatz zur oben dargestellten organhemmenden, besteht zwischen Scheitelzelle und Archegonien; männliche Organe werden unabhängig vom Vorhandensein einer Scheitelzelle angelegt, Archegonien nur unmittelbar hinter Scheitelzellen.

Die *Aposporie* des Sporophyten wird in gewissen Fällen der Regeneration einzelner isolierter Zellen des Gametophyten ähnlich sein; dann nämlich, wenn aus dem allmählich absterbenden Gewebe des Sporophyten Prothallien hervortreten. Bei der Aposporie von Asplenien (D. MEYER 1952, S. 13) wachsen die Prothallien am Grunde der Sporophytprimärblätter zunächst nach unten in den Agar hinein, später an dessen Oberfläche (Abb. 3); dies ist derselbe Vorgang, wie er oben für die isolierten Zellen beschrieben wurde. — Die Ansatzstellen der apospor entstandenen Gametophyten an den Sporophyten sind punktförmig, so daß ihr Entstehen aus einer einzigen Zelle, die durch Absterben der Nachbarzellen isoliert wurde, sehr wahrscheinlich ist. Isolierte Farnzellen verhalten sich wie ein normales einzelliges Gebilde: die Spore. — Auch Plasmolyse isoliert Prothalliumzellen, indem sie die Plasmodesmen zerreißt, deshalb führt sie zur Regeneration (ISABURO-NAGAI 1914, S. 305). Diesen Befund mit einem besonderen Reizstoff als teilungsanregendem Agens in Beziehung zu bringen, gelang HABERLANDT nur schwierig (1919, S. 327, 345, 348). — Regeneration einer einzelnen Zelle, wie Regeneration am Prothallium allgemein, sind eine Folge der Enthemmung. Dies sind die Fragen LINSBAUERS; sie gehen zurück auf GOEBEL (1902,

S. 487), der im Differenzierungsgeschehen der Pflanzen ein reversibles Latentwerden sieht, eine „Inkrustation"; nicht ein Verlust von Potenzen, eine Determinierung, wie sie im Tierreich überwiegt. Jede pflanzliche Zelle ist eine gehemmte Gesamtpflanze. Deshalb ist eine besondere Keimbahn zur Bewahrung der omnipotenten Zellen nicht nötig; deshalb findet sich das Vermögen zur vegetativen Reproduktion durch das gesamte Pflanzenreich und an allen Teilen der pflanzlichen Gestalt. —

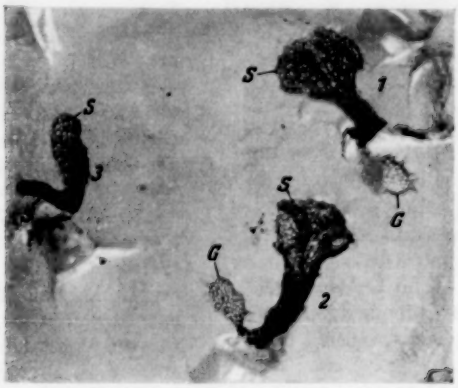


Abb. 3. Aposporie bei *Asplenium ruta-muraria*. Am Grund zerschnittener Primärblätter entstehen Prothallien. *S* Sporophyt, *G* Gametophyt. *1* In ungestörter Lage. Das Prothallium wächst zunächst in den Agar, später an dessen Oberfläche. *2* Verhielt sich wie *1*, jedoch das Prothallium aus dem Agar gehoben. Die äußerlich sichtbare Ansatzstelle des Gametophyten an den Sporophyten ist 2 Zellen breit. *3* Oben ein Regenerat mit breiter Ansatzstelle, das später ein Sporophyt wurde.

Daß eine im Normalfall völlig differenzierte Zelle, die durch äußere Einwirkungen aus dem Korrelationszusammenhang mit ihren Nachbarzellen gelöst wird, zu eigener Teilungsgesetzlichkeit frei wird, ist für Gallenbildungen und das Krebsproblem von Bedeutung.

Literatur.

Albaum, H. G.: Normal growth, regeneration, and adventitious outgrowth formation in fern prothallia. Amer. J. Bot. **25**, 37 (1938). — Goebel, K.: Entwicklungsgeschichte des Prothalliums von *Gymnogramme leptophylla* Desv. Bot. Z. **35**, 671, 681, 697 (1877). — Über Regeneration im Pflanzenreich. Biol. Cbl. **22**, 385, 417, 481 (1902). — Haberlandt, G.: Zur Physiologie der Zellteilung. 3. Mitt.: Über Zellteilungen nach Plasmolyse. Sitzgsber. preuß. Akad. Wiss., Physik.-math. Kl. **20**, 322 (1919). — Heilbronn, A.: Über Entdifferenzierung, Istanbul 8 S. 1946. — Isaburo-Nagai: Physiologische Untersuchungen über Farnprothallien. Flora (Jena), N. F. **6**, 281 (1914). — Küster, E.: Die Pflanzenzelle, 2. Aufl. Jena 1951. — Lawton, E.: Regeneration and induced polyploidy in ferns. Amer. J. Bot. **19**, 303 (1932). — Linsbauer, K.: Rückdifferenzierung als Voraussetzung ontogenetischer Entwicklung. Flora (Jena), N. F. **18/19**, 346 (1925). Über Regeneration der Farnprothallien und die Frage der „Teilungsstoffe". Biol. Zbl. **46**, 80 (1926). — Meyer, D. E.: Untersuchungen über Bastardierung in der Gattung *Asplenium*. Biblioth. Bot. **30**, H. 123 (1952).

Dr. D. E. Meyer, Berlin-Dahlem,
Botanisches Museum, Königin-Luise-Str. 6—8.

Autorenverzeichnis des 41. Bandes.

Alexander, I., Entwicklungsstudien an Blüten von Cruciferen und Papaveraceen. S. 125.

Betz, A., Untersuchungen über Verhalten und Wirkung der Vitalfarbstoffe Prune pure und Akridinorange sowie Beobachtungen über das Reduktions-Oxydationspotential in Zellen höherer Pflanzen. S. 323.

Bogen, H. J., und H. Prell, Messung nichtosmotischer Wasseraufnahme an plasmolysierten Protoplasten S. 459.

Dettweiler, Ch., Zusammenhänge zwischen Austreiben und Atmung bei der Kartoffelknolle. I. Mitteilung. Die Hemmung des Austreibens durch Fermentinhibitoren, insbesondere Urethane. S. 214.

Drawert, H., Kritische Untersuchungen zur gravimetrischen Bestimmung der Wasserpermeabilität. Ein Beitrag zum Einfluß der c_H auf die Wasseraufnahme und -abgabe. S. 65.

— Teratologische Erscheinungen an *Bryophyllum daigremontianum* Berger. S. 509.

Engel, W., Untersuchungen über die Kieselsäureverbindungen im Roggenhalm. S. 358.

Franke, W., Die Wirkung des Vitamins C auf die Atmung von Keimlingen. S. 197.

Guttenberg, H. von, und H.-L. Wiedow, Über den Wirkstoffbedarf isolierter Haferembryonen. S. 145.

— s. Meinl, G. S. 167.

— s. Wiedow, H. L. S. 589.

Haccius, B., Histogenetische Untersuchungen an Wurzelhaube und Kotyledonarscheide geophiler Keimpflanzen (*Podophyllum und Eranthis*). S. 439.

Hanf, M., Verwachsungen an Laubblättern und in Kompositenköpfchen, verursacht durch wuchsstoffhaltige Unkrautbekämpfungsmittel. S. 515.

Harder, R., und A. Oppermann, Einfluß von 2,3,5-Trijodbenzoesäure auf die Blütenbildung und die vegetative Gestaltung von *Kalanchoë Bloßfeldiana* S. 1.

Huber, B., Bemerkung zu der Mitteilung von W. Kausch: Physiologische Wirkungen kleinster Saugkräfte. S. 64.

Kandler, O., und A. Vieregg, Über den Einfluß von β-Indolylessigsäure auf den Stoffwechsel in vitro kultivierter Maiswurzeln und Spargelsprosse. S. 613.

Kausch, W., Physiologische Wirkungen kleinster Saugkräfte. (Kurze Mitteilung.) S. 59.

Krause, W., Das Mosaik der Pflanzengesellschaften und seine Bedeutung für die Vegetationskunde. S. 240.

Krech, E. s. Paech, K. S. 391.

Libbert, E., Die Wirkung der Alkali- und Erdalkaliionen auf das Wurzelwachstum unter besonderer Berücksichtigung des Ionenantagonismus und seiner Abhängigkeit von Milieufaktoren. S. 396.

Linser, H., Empfindlichkeitsunterschiede für Wuchsstoffe bei Koleoptilen und Primärblättern monocotyler, sowie bei Epi- und Hypocotylen dicotyler Pflanzen. S. 25.

— und F. Maschek, Kolorimetrische und biologische Bestimmung sowie chromatographische Trennung von Wuchsstoffen aus Pflanzen. S. 567.

Linskens, H. F., Über die Änderungen der Benetzbarkeit von Blattoberflächen und deren Ursache. S. 40.

Maschek, F. s. Linser, H. S. 567.

Meinl, G., und H. von Guttenberg, Über den Einfluß von Wirkstoffen auf die Permeabilität des Protoplasmas. III. und IV. Mitteilung. S. 167.

Meyer, D. E., Über das Verhalten einzelner isolierter Prothalliumzellen und dessen Bedeutung für Korrelation und Regeneration. S. 642.

Oppermann, A. s. Harder, R. S. 1.

Paech, K., Über die Lichtkeimung von *Lythrum salicaria*. (Ein Beitrag zur Physiologie der Polyphenole.) S. 525.

Paech, K., und E. Krech, Über die Stärkebildung in den Plastiden. S. 391.

Prell, H., Untersuchungen über die Aufnahme von Anelektrolyten in Zellen di- und polyploider Pflanzen. S. 480.

— s. Bogen, H. J. S. 459.

Reese, G., Hochgradige Dysploidie bei *Caltha palustris* L. S. 195.

Ried, A., Photosynthese und Atmung bei xerostabilen und xerolabilen Krustenflechten in der Nachwirkung vorausgegangener Entquellungen. (Kurze Mitteilung.) S. 436.

Schenk, W., Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Lichtfeld und Chlorophyllgehalt an Sproßrinden und Blättern von Holzgewächsen. S. 290.

Trautmann, W., Pollenanalytische Untersuchungen über die Fichtenwälder des Bayerischen Waldes. S. 83.

Vieregg, A. s. Kandler, O. S. 613.

Wanner, H., Phosphataseverteilung und Kohlenhydrattransport in der Pflanze. S. 190.

Weber, H., Gramineen-Studien. IV. Mitteilung. Dorninfloreszenzen und Blattdornen bei Gräsern. S. 311.

Wiedow, H.-L., und H. v. Guttenberg, Über die Abhängigkeit der Wirkstoffbildung von Licht und Photosynthese. S. 589.

— s. Guttenberg, H. von S. 145.

Winter, E., Ascorbinsäure-Synthese in Gewebeschnitten. S. 52.